Bruno Cossermelli Vellutini

Desenvolvimento e ciclo reprodutivo da bolacha-do-mar *Clypeaster subdepressus* (Echinodermata: Echinoidea) de São Sebastião, SP



Bruno Cossermelli Vellutini

Desenvolvimento e ciclo reprodutivo da bolacha-do-mar *Clypeaster subdepressus* (Echinodermata: Echinoidea) de São Sebastião, SP

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Zoologia.

Orientador: Alvaro Esteves Migotto

São Paulo 2008 Vellutini, Bruno C.

Desenvolvimento e ciclo reprodutivo da bolacha-do-mar Clypeaster subdepressus (Echinodermata: Echinoidea) de São Sebastião, SP

142 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia.

1. Embriologia

2. Larva

3. Reprodução

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Zoologia.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Nome Prof. Dr. Nome

Prof. Dr. Alvaro Esteves Migotto

 \grave{A} minha família

O que é bonito?

O que é bonito? É o que persegue o infinito; Mas eu não sou Eu não sou, não... Eu gosto é do inacabado, O imperfeito, o estragado, o que dançou O que dançou... Eu quero mais erosão Menos granito. Namorar o zero e o não, Escrever tudo o que desprezo E desprezar tudo o que acredito. Eu não quero a gravação, não, Eu quero o grito. Que a gente vai, a gente vai E fica a obra, Mas eu persigo o que falta Não o que sobra. Eu quero tudo que dá e passa. Quero tudo que se despe, Se despede, e despedaça. O que é bonito...

Lenine e Bráulio Tavares

Agradecimentos

Ao meu orientador Alvaro Esteves Migotto pela dedicação, amizade e fascínio pela vida marinha, pelos ensinamentos sobre fotografia e pelo grande entusiasmo durante as filmagens feitas neste projeto.

Ao Antonio Carlos Marques (IBUSP) pelas conversas decisivas para minhas escolhas acadêmicas.

Ao Renato Ventura pelo incentivo e apoio ao longo deste projeto e pela estadia na Seção de Echinodermata do Museu Nacional do RJ, e à Mariana Contins pela companhia.

A todos os integrantes do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva (ICBUSP) onde começou meu interesse por invertebrados marinhos e onde realizei os cortes histológicos deste projeto. José Roberto M. C. da Silva, pelas portas abertas e apoio com a histologia; Leandro N. Pressinotti, pela amizade de longa data e pela sabedoria com que encara o mundo; João Carlos S. Borges, pela amizade e perseverança no estudo dos celomócitos; Emília Ribeiro, pela amizade e apoio técnico que ajudaram muito neste projeto.

À FAPESP pelo apoio financeiro (2006/01898-7).

À Irene Yan (ICBUSP) pelo esforço, apoio e oportunidades na biologia do desenvolvimento.

À Sally Leys, Billie Swalla, Richard Strathmann e Richard Emlet por tudo que aprendi nos cursos de Embriologia Comparativa de Invertebrados e Biologia Larval em 2006, e a todos os bons amigos que fiz em Friday Harbor.

Ao Rich Mooi, maior entusiasta das bolachas-do-mar que conheço, pelas opiniões e ajuda com bibliografia.

Ao Alberto Lindner, Inácio D. Silva Neto e Alvaro Esteves Migotto, fotógrafos da exposição "Oceano: vida escondida", por esta grande experiência.

Ao Augusto Flores pela animação com a biologia de larvas experimental e Cláudio Tiago pelo contato inicial com o CEBIMar e doação do livro mais utilizado neste projeto.

Aos funcionários do CEBIMar, em especial aos técnicos Joseph Sebroeck, Joseilto

de Oliveira e Eduardo Honuma pela ajuda essencial nas coletas; a Virgínia Castilho e Wagney da Costa pela grande ajuda com bibliografias e outros assuntos digitais; a Lenise Raplavschi, Simone Galante, Elaine Galhardo, Cleide da Silva pelo apoio técnicoadministrativo; e à fabulosa cozinha do CEBIMar.

Aos que me ajudaram com a microscopia eletrônica de varredura, Enio Mattos (IBUSP) pelo ponto crítico e Inácio D. Silva Neto (UFRJ), Sandra Affonso (FMVZUSP) e Lara Guimarães (MZUSP) pelas imagens. À Toshie Kawano e Alexsander S. de Souza (Instituto Butantan) pelas imagens no Confocal.

À Marta Stephan do Laboratório de Cultura de Microorganismos Aquáticos do IOUSP pelo fornecimento das microalgas.

Aos docentes das disciplinas de pós-graduação, José Guilherme Berlinck (IBUSP), Márcio Custódio (IBUSP) e Janet Reid pelo aprendizado.

À Mariana Capparelli, Andréia Barbosa, Laura Branco e Sara Vilar, fundadoras da primeira república do CEBIMar (BECO), pela companhia e amizade; à Flora Sarti pela companhia no início do projeto; ao Otto M. P. de Oliveira pelas dicas iniciais no CEBIMar; ao Leandro M. Vieira pela amizade, conversas e companhia durante o mestrado, e a muitos outros amigos que conheci no CEBIMar.

A todos os grandes amigos da BioUSP 2001 Noturno pela diversão, ensinamentos e amizades ao longo destes 7 anos. Ao A.B.E.R.T.O. onde tudo começou e ainda não acabou. Ao Lamarck Basquetebol Arte por prover os únicos momentos de esporte durante este projeto e por sempre lembrar que o basquete nos faz crescer.

Ao Rodrigo Curvo, Marcelo Lane e Vitor Rodrigues do Aygan, pela música e compreensão com minhas inúmeras ausências.

A minha família (Eduardo, Diane, Gustavo e Luísa), pelo apoio inestimável aos meus projetos, ajuda nas escolhas difíceis e muito carinho sempre.

À Juliana Roscito, meu grande romance, pelo seu amor e companhia que foram fundamentais durante todas as fases deste trabalho.

Resumo

Este trabalho descreve o desenvolvimento embrionário, larval e juvenil da bolacha-do-mar *Clypeaster subdepressus* sob microscopia de luz e eletrônica de varredura. Analisamos também o ciclo reprodutivo da espécie a partir de cortes histológicos das gônadas. A evolução morfológica da ordem Clypeasteroida (bolachas-do-mar), cerca de 55 milhões de anos atrás, esteve relacionada à ocupação de fundos arenosos. Dados morfológicos recentes e fósseis sugerem que durante a evolução das bolachas-do-mar houve retenção de características juvenis na fase adulta. Obtivemos gametas através da injeção de KCl em indivíduos adultos e fizemos a fecundação in vitro. Mantivemos os embriões e larvas em culturas a 26 °C, e alimentamos as larvas com microalgas. Os óvulos (diâmetro médio de 160 µm) são esféricos translúcidos e brancos. Após a entrada do espermatozóide, o envelope vitelínico endurece entre 2 e 6 min; o pró-núcleo masculino inicia a migração da região periférica do óvulo até o centro 5 min depois, levando 12 min à 0,1 µm/s para se fundir ao pró-núcleo feminino. As clivagens são holoblásticas, com a formação de macrômeros, mesômeros e micrômeros. A blástula forma-se entre 3,5 e 6,5 h após a fecundação (hpf), desenvolve cílios e eclode da membrana de fertilização 7,5 hpf. A gastrulação inicia-se na placa vegetativa com a ingressão unipolar das células mesenquimais primárias 10 hpf. A extensão do arquêntero, ingressão das células mesenquimais secundárias e formação do esqueleto larval estendem-se até 30 hpf. Em menos de 48 hpf os espaços celômicos estão formados e no terceiro dia as larvas iniciam sua alimentação. O hidróporo abre-se na superfície abanal da larva e a invaginação do vestíbulo ocorre entre o braço pós-oral e o póstero-dorsal, do lado esquerdo, ao redor do quinto dia. O vestíbulo funde-se ao celoma esquerdo formando o rudimento, que desenvolve espinhos e pés ambulacrais ainda dentro da larva. As larvas tornam-se competentes $\sim 20 \,\mathrm{d}$ após a fecundação e somente iniciam a metamorfose pela manhã, após contato com areia do habitat dos adultos ou microalgas.

Após a eversão completa do rudimento, o epitélio larval regride por 1 h 30 min. Jovens pós-metamórficos não têm boca ou ânus; possuem 15 espinhos e 15 pés ambulacrais (de 2 tipos); 5 esferídios na superfície oral; a superfície aboral ainda não possui esqueleto, exceto os remanescentes do esqueleto larval. Rudimentos do esqueleto da lanterna de Aristóteles estão organizados em 5 conjuntos com 1 dente, 2 hemipirâmides, 2 epífises cada; rudimento da rótula encontra-se intercalado entre os conjuntos. Hemipirâmides e dentes formam-se 2 d após a metamorfose (dpm); dentes tornam-se mais robustos e as hemipirâmides se fundem formando as pirâmides 7 dpm. O tubo digestório aparece e o ânus abre-se na superfície aboral 2 dpm. A membrana peristomial torna-se funcional formando a boca 7 dpm. Pedicelárias oficéfalas e tridentadas surgem na região posterior 14 dpm e 30 dpm, respectivamente. O crescimento dos jovens criados em laboratório foi lento: jovens pós-metamórficos tinham $\sim 250 \,\mu\text{m}$ de diâmetro e atingiram $\sim 500 \,\mu\text{m}$ de diâmetro 8 meses depois. Descrevemos 6 estágios de maturação gonadal para machos e fêmeas de C. subdepressus. Encontramos estágios de proliferação e gametas maduros com maior freqüência entre dezembro e março (verão), enquanto estágios de recuperação predominaram de maio a setembro (inverno). Fêmeas apresentaram um período de recuperação mais longo do que machos. A área ocupada pelo epitélio germinativo em um túbulo gonadal em corte transversal foi menor em indivíduos maduros. No estágio prematuro, as gônadas estiveram mais pesadas. Dados sugerem que exista um ciclo reprodutivo anual nas populações de C. subdepressus em São Sebastião, onde a recuperação das gônadas ocorre no inverno, o acúmulo de nutrientes a partir de outubro e a liberação de gametas entre fevereiro e março.

Abstract

Embryonic, larval, and juvenile development of the sea biscuit *Clypeaster subdepressus* is described with light and scanning electron microscopy. The reproductive cycle of the species is analyzed based on histological sections of the gonads. The morphological evolution of the order Clypeasteroida (sand dollars and sea biscuits), about 55 million years ago, was associated with the occupation of sand beds. Data on morphology of living and fossil echinoids suggests that during the evolution of sea biscuits juvenile characters were retained into adulthood. We obtained ripe gametes by KCl injection into the perivisceral coelomic cavity of adults and fertilized the eggs in vitro. We kept embryos and larvae in cultures at 26 °C and fed larvae with microalgae. Eggs (mean diameter of 160 µm) are spherical, translucent, and white. After sperm entry, the vitelline envelope hardens between 2 and 6 min; male pro-nucleus begins to migrate towards the center of the egg 5 min later, taking 12 min at $0.1 \,\mu\text{m/s}$ to fuse with the female pronucleus. Cleavages are holoblastic with the formation of macromeres, mesomeres, and micromeres. Blastulae are formed between 3.5 and 6.5 h after fertilization (hpf), develop cilia, and hatch 7.5 hpf. Gastrulation begins on the vegetal plate with the unipolar ingression of primary mesenchyme cells 10 hpf. Archenteron extension, ingression of secondary mesenchyme cells, and the formation of larval skeleton occurs until 30 hpf. In less than 48 hpf the celomic pouches are formed and on day 3 larvae begin to feed. Hidropore opens on the abanal surface of larvae while vestibule invagination takes place between the post-oral and postero-dorsal arms on the left side 5 dpf. Vestibule fuses with the left celom forming a rudiment which develops spines and podia still inside the larvae. Larvae become competent $\sim 20 \,\mathrm{d}$ after fertilization and only metamorphose in the morning, after contact with sand from adult populations or food. After complete eversion of the rudiment, the larval epidermis retraction takes 1 h 30 min. Post-metamorphic

juveniles do not have anus or mouth; they have 15 spines and 15 podia (of 2 types); 5 sphaeridia on the oral surface; aboral surface does not have plates, except for the remnants of larval spicules. Rudiments of the Aristotle's lantern are organized in 5 groups. Each group has 1 tooth, 2 hemipiramids, and 2 epiphysis; a rudiment rotula is placed between the groups. Hemipiramids are formed 2d after metamorphosis (dpm); teeth become more robust and hemipiramids fuse into piramids 7 dpm. The digestive tract appears and the anus opens on the aboral surface 2 dpm. The peristomial membrane is functional and the mouth opens 7 dpm. Ophicephalous and tridentate pedicellariae appear on the posterior region 14 dpm and 30 dpm, respectively. Growth of juveniles reared in the laboratory was slow: post-metamorphic juveniles were $\sim 250 \,\mu\text{m}$ in diameter and reached $\sim 500 \,\mu\text{m}$ 8 months later. We described 6 stages of gonadal growth in males and females of C. subdepressus. We found premature stages and ripe gametes more frequently between December and March (summer), while recovery stages were dominant from May until September (winter). Females have a longer period of growing stage than males. The area occupied by the germinal epithelium on a transverse section of a gonadal lobe is lower in mature stage. Gonads are heavier during the premature stage. Data suggest that C. subdepressus from São Sebastião has an annual reproductive cycle where gonadal recovery occurs during winter, nutrient storage by October, and spawning between February and March.

Sumário

Lista de Figuras			3	
Li	Lista de Tabelas			
N	omer	nclatur	a	7
1	Intr	roduçã	0	9
	1.1	Histór	ico da biologia do desenvolvimento	9
	1.2	Echine	odermata e desenvolvimento	10
	1.3	Evolu	ção das bolachas-do-mar	11
2	Des	envolv	imento embrionário, larval e juvenil	15
	2.1	Introd	lução	15
2.2 Materiais e Métodos		iais e Métodos	16	
		2.2.1	Coleta dos adultos	16
		2.2.2	Obtenção dos gametas	18
		2.2.3	Fecundação	18
		2.2.4	Culturas	19
		2.2.5	Cinética das clivagens	21
		2.2.6	Microscopia de luz	22
		2.2.7	Microscopia Eletrônica de Varredura	23

Sumário

	2.3	Result	$ados \dots \dots$	23
		2.3.1	Liberação dos gametas	23
		2.3.2	Gametas	26
		2.3.3	Fecundação	26
		2.3.4	Clivagens	30
		2.3.5	Blástula	37
		2.3.6	Gástrula	38
		2.3.7	Plúteos	15
		2.3.8	Metamorfose 5	52
		2.3.9	Jovem	56
	2.4	Discus	ssão	37
3	Cic	lo repr	odutivo 7	'9
	3.1	Introd	ução	79
	3.2	Mater	iais e Métodos	30
		3.2.1	Coleta dos adultos	30
		3.2.2	Dissecção	31
		3.2.3	Índice gonadal	34
		3.2.4	Histologia	34
		3.2.5	Análise	34
	3.3	Result	ados	36
		3.3.1	Anatomia	36
		3.3.2	Índice Gonadal	37
		3.3.3	Histologia	<i>)</i> 0
		3.3.4	Ciclo Reprodutivo	23
	3.4	Discus	ssão $\ldots \ldots 12$	26
-	. .			

Referências Bibliográficas

2

133

Lista de Figuras

2.1	Locais de coleta de <i>Clypeaster subdepressus</i> 17
2.2	C. subdepressus em vista oral e aboral 17
2.3	Gonóporos e liberação dos gametas
2.4	Óvulos de <i>C. subdepressus</i>
2.5	Elevação do envelope vitelínico
2.6	Migração dos pró-núcleos
2.7	Membrana hialina sob MEV
2.8	Clivagens: 2, 4 e 8 células 33
2.9	Clivagens: 8 e 16 células
2.10	Clivagens: 32 e 56 células 35
2.11	Clivagens: 108 células 36
2.12	Cinética das clivagens
2.13	Formação da blástula
2.14	Eclosão da blástula
2.15	Gastrulação: ingressão das CMP 41
2.16	Gastrulação: migrações celulares e invaginação do arquêntero
2.17	Células colunares no pólo vegetativo
2.18	Gastrulação e formação do prisma
2.19	Prisma sob MEV

2.20	Diferenciação da larva plúteos	47
2.21	Braços da larva plúteos	48
2.22	Formação dos celomas, sistema digestório e hidróporo	50
2.23	Celomas no confocal	51
2.24	Formação do vestíbulo e rudimento	53
2.25	Desenvolvimento do rudimento	54
2.26	Comportamento de "teste de substrato"	55
2.27	Metamorfose de <i>C. subdepressus</i>	57
2.28	Jovem pós-metamórfico	59
2.29	Jovem recém metamorfoseado sob MEV	60
2.30	Pés ambulacrais sob MEV	60
2.31	Formação da lanterna de Aristóteles	62
2.32	Estruturas da superfície aboral do jovem	63
2.33	Membrana peristomial e boca	64
2.34	Superfície oral sob MEV	65
2.35	Locomoção do jovem	66
2.36	Pedicelária oficéfala	67
3.1	Representação de C subdepressus adulto	82
3.2	Gônada de <i>C. subdepressus</i> dissecada	83
3.3	Análise morfométrica dos cortes histológicos	86
3.4	Gônada de <i>C. subdepressus</i> após excisão, descalcificação e limpeza	88
3.5	Distribuição de peso de <i>C. subdepressus</i>	89
3.6	Médias do peso gonadal por estágios gonadais	89
3.7	Correlação entre peso gonadal e peso corpóreo	91
3.8	Organização tecidual da gônada de <i>C. subdepressus</i>	92
3.9	Fêmea no estágio de recuperação	94

3.10	Fêmea no estágio de proliferação
3.11	Fêmea no estágio prematuro
3.12	Fêmea no estágio maduro
3.13	Fêmea no estágio pós-liberação
3.14	Fêmea no estágio depleção
3.15	Grânulos PAS+ nas fêmeas
3.16	Oogênese
3.17	Óvulos
3.18	Macho no estágio de recuperação
3.19	Macho no estágio de proliferação
3.20	Epitélio germinativo no estágio de proliferação (macho)
3.21	Agregados no estágio de proliferação (macho)
3.22	Macho no estágio prematuro
3.23	Macho no estágio maduro
3.24	Macho no estágio de pós-liberação
3.25	Vilosidade no estágio de pós-liberação (macho)
3.26	Fagocitose no estágio de pós-liberação (macho)
3.27	Macho no estágio de depleção
3.28	Grânulos PAS+ nos machos
3.29	Espermatogônias
3.30	Porcentagem da área ocupada pelo epitélio germinativo
3.31	Correlação entre área do epitélio germinativo e área total de túbulos $\ .\ .\ .\ 121$
3.32	Resíduos da correlação entre área do epitélio e área total de túbulos 122
3.33	Diâmetro de túbulos gonadais por estágio gonadal
3.34	Freqüências relativas mensais de cada estágio gonadal

Lista de Tabelas

2.1	Fertilização à eclosão
2.2	Gastrulação à metamorfose 42
2.3	Metamorfose e desenvolvimento pós-metamórfico
3.1	Médias do peso gonadal por estágio gonadal
3.2	Valores de P entre média dos pesos gonadais de cada estágio $\ldots \ldots 90$
3.3	Porcentagem da área ocupada pelo epitélio germinativo
3.4	Valores de P entre médias da área ocupada pelo epitélio germinativo $\ . \ . \ 120$
3.5	Valores de P para resíduos
3.6	Freqüências relativas mensais de cada estágio gonadal
3.7	Freqüências relativas mensais de cada estágio gonadal das fêmeas 124
3.8	Freqüências relativas mensais de cada estágio gonadal dos machos 126

Nomenclatura

an	ânus	em	epitélio muscular
bc	blastocele	ер	espaço dos pilares ósseos
bo	boca	esf	esôfago
cc	células colunares	est	estômago
ce	celoma	ez	espermatozóides
ci	câmara incubadora	fg	fagossomo
cl	celomócitos	$_{\mathrm{fn}}$	fagócito nutritivo
		g	gonoduto
CMP	células mesenquimais primárias	gc	grânulos corticais
CMS	células mesenquimais secundárias	ge	glóbulos escuros
dpm	dias após metamorfose	gh	glóbulos hialinos
ed	espinho posterior	hpf	horas após fertilização
ef	esferídio	lb	lâmina basal
eg	espermatogônia	ln	lúmen
eh	espaço hemal	m	mesentério

MEV	microscopia eletrônica de varredura	ро	braços pós-orais
mt	mitose	sg	seio genital
og	oogônia	ta	tufo apical
oppv	oócito primário pré-vitelogênico	tg	tecido gonadal
opv	oócito primário vitelogênico	tgi	tecido gonadal sob intestino
or	oócito residual	v	vilosidade
ov	óvulo	vc	vacúolo

Capítulo 1

Introdução

1.1 Histórico da biologia do desenvolvimento

A Teoria Sintética da Evolução, formulada entre 1937 e 1950, incorporou dados da genética, sistemática e paleontologia na teoria da evolução descrevendo os processos evolutivos como conseqüência da variação entre indivíduos de uma população (Buss, 1987; Kutschera e Niklas, 2004).

Esta síntese, no entanto, teve uma peculiaridade histórica. Os embriologistas não participaram da construção da teoria sintética, pois não eram bem sucedidos ao tentarem explicar os fenômenos do desenvolvimento (e.g., diferenciação celular) através de interpretações genéticas da época (ver detalhes em Buss, 1987; Arthur, 2002). Com isso, as linhas de pesquisa sobre evolução e embriologia divergiram, caminhando quase paralelamente até ~1980 (Gilbert, 1997; Arthur, 2002, 2004; Kutschera e Niklas, 2004).

Apenas com o aprimoramento das técnicas moleculares, a partir da segunda metade do século 20, foi possível encontrar evidências experimentais de como o desenvolvimento pode influenciar a evolução e de como a genética participa dos fenômenos do desenvolvimento.

Uma das principais descobertas, que iniciou as inferências do desenvolvimento so-

bre a evolução, foi a descrição de genes regulatórios denominados *homeobox* (Arthur, 2002). Devido a ampla distribuição filogenética e influência direta nos padrões de desenvolvimento, foi imediatamente reconhecida sua importância nos processos evolutivos (Kutschera e Niklas, 2004). Finalmente, uma base teórica para a relação entre o desenvolvimento embrionário e a evolução começava a se desenvolver.

A vertente evolutiva da biologia do desenvolvimento, que sempre abordou questões como modularidade, restrições do desenvolvimento e heterocronia, está hoje sob grande influência de ferramentas computacionais desenvolvidas em áreas como a genômica e modelagem de sistemas biológicos (Dover, 2000). A integração entre as duas áreas aborda diretamente a relação entre a genética e a evolução do fenótipo (Mabee, 2006), considerando os organismos como um sistema complexo de redes regulatórias genéticas, módulos e processos emergentes (Kurakin, 2005).

1.2 Echinodermata e desenvolvimento

Os equinodermos foram uns dos primeiros organismos a serem utilizados em estudos embriológicos comparativos, devido à transparência de seus óvulos e embriões, facilidade de manipulação e abundância de gametas produzidos por um único organismo (Hart, 2002).

Diferentemente dos insetos e nematódeos, onde o estabelecimento de modelos genéticos do desenvolvimento concentrou os estudos em *Drosophila* e *Caenorhabditis*, os equinodermos foram estudados de forma descentralizada, permitindo a criação de um amplo quadro comparativo com os padrões de desenvolvimento de inúmeras espécies de cada classe (Hart, 2002).

A classe Echinoidea compreende os populares ouriços-do-mar e bolachas-do-mar, e algumas outras formas menos abundantes e pouco conhecidas. Sobre esta classe há um grande volume de dados de desenvolvimento, sobretudo a respeito da diversidade de formas larvais (e.g., Mortensen, 1921; Wray e Bely, 1994; Wray, 1996; Smith, 1997; McEdward e Miner, 2001). Estes dados ontogenéticos permitiram gerar hipóteses e fazer inferências a respeito da evolução das linhagens celulares dos equinodermos ao longo de seus 550 milhões de anos de evolução (Wray e Bely, 1994). Alguns trabalhos revelaram fenômenos interessantes, como a drástica alteração morfológica nas larvas e reorganização das fases iniciais do desenvolvimento, em conseqüência da evolução da lecitotrofia, sem que a morfologia adulta fosse alterada (Raff, 1992; Wray, 1995).

1.3 Evolução das bolachas-do-mar

Theodor Mortensen, na sua série de monografias sobre os Echinoidea (*A Monograph of the Echinoidea*, 1928-1951), estabeleceu ordens para o táxon Irregularia: Holectypoida, Cassiduloida, Spatangoida e Clypeasteroida (Mortensen, 1948). As origens das três primeiras ordens datam de cerca de 175 milhões de anos atrás (Smith e Anzalone, 2000), enquanto as bolachas-do-mar (ordem Clypeasteroida) apareceram somente há 55 milhões de anos (Kier, 1982). No Eoceno Médio (49 a 37 milhões de anos atrás) os clipeasteróides estavam distribuídos por todo o mundo, incluindo as formas mais derivadas, mostrando uma rápida evolução morfológica e dispersão (Kier, 1982).

Os equinóides irregulares foram recentemente considerados um clado monofilético (Saucède et al., 2007). Algumas sinapomorfias do grupo foram descritas, como o ânus relativamente grande, encurtamento dos espinhos primários e achatamento do corpo (Saucède et al., 2007). No entanto, a característica mais marcante das bolachas-do-mar é a simetria bilateral imposta sobre a simetria pentâmera ancestral. O ânus encontra-se deslocado da posição central típica de equinóides regulares, tendo migrado para a região posterior de forma independente entre os táxons do clado (Saucède et al., 2007).

A ordem Clypeasteroida é facilmente reconhecida pela presença de mais de um pé ambulacral em cada placa ambulacral, e por serem os únicos equinóides irregulares atuais cujos adultos têm lanterna de Aristóteles e arcos perignáticos. A inclusão do registro fóssil nas análises morfológicas indica que esta ordem originou-se de uma linhagem da ordem Cassiduloida (Mooi, 1990; Smith, 2001). A análise filogenética sugere que durante a evolução de Clypeasteroida houve retenção de caracteres juvenis na fase adulta e alterações morfológicas associadas à ocupação de um novo ambiente (Mooi, 1990).

Umas das evidências a favor dessa hipótese é a semelhança entre a lanterna de Aristóteles de adultos da ordem Oligopygoida (grupo-irmão extinto de Clypeasteroida) e a lanterna de cassidulóides jovens (adultos da ordem Cassiduloida não têm lanterna de Aristóteles) (Mooi, 1990). Esta semelhança sugere que a origem do clado das bolachasdo-mar tenha ocorrido a partir de alguma linhagem de Cassiduloida cuja fase adulta reteve a lanterna de Aristóteles. Neste contexto, conhecer os padrões do desenvolvimento presentes em Clypeasteroida e Cassiduloida são essenciais para testar hipóteses e levantar informações a respeito dos processos evolutivos envolvidos.

O desenvolvimento dos equinóides irregulares assemelha-se ao modelo dos regulares (Emlet, 1986). É interessante notar, contudo, que na evolução dos Irregularia houve alteração no plano corpóreo do adulto sem grandes alterações no desenvolvimento e formas larvais, enquanto em inúmeros equinóides regulares houve a diferenciação do desenvolvimento sem mudança na morfologia adulta, como mencionado na seção 1.2. Esses fenômenos levantam questões importantes sobre o balanço entre seleção natural e restrições do desenvolvimento atuando na evolução morfológica. Além disso, revelam uma certa independência dos processos evolutivos que atuam nas fases larvais e nos adultos, fazendo destes organismos bons modelos para estudar a relação entre evolução e desenvolvimento.

Neste trabalho descrevemos o desenvolvimento e ciclo reprodutivo da bolacha-do-mar *Clypeaster subdepressus* (Gray, 1825) do canal de São Sebastião. Essa espécie de equinóide Clypeasteroida (família Clypeasteridae) é encontrada nos mares do Caribe e ao longo de toda costa leste das Américas, da Carolina do Norte (EUA) ao Rio de Janeiro (Hendler et al., 1995) e São Paulo (Tommasi, 1966; Netto et al., 2005). *C. subdepressus* habita fundos arenosos de regiões litorâneas, vivendo enterrado ou semi-enterrado e alimentando-se de material orgânico, incluindo diatomáceas (Mortensen, 1948; Hendler et al., 1995).

Este trabalho foi subdividido em capítulos para facilitar a apresentação dos resultados. As descrições do desenvolvimento embrionário, larval e juvenil de *C. subdepressus* são apresentadas no Capítulo 2 e a caracterização do ciclo reprodutivo no Capítulo 3.

Capítulo 2

Desenvolvimento embrionário, larval e juvenil

2.1 Introdução

A bolacha-do-mar *Clypeaster subdepressus* vem sendo utilizada em estudos de desenvolvimento com alguma freqüência (Emlet, 1986; Miner et al., 2005; Reitzel e Heyland, 2007; Smith et al., 2007; Zigler et al., 2008). Emlet (1986) foi o primeiro a mostrar que a espécie apresenta desenvolvimento indireto com larva planctotrófica obrigatória. Entretanto, sua descrição sucinta é focada nos tempos de desenvolvimento das larvas, enquanto trabalhos posteriores tiveram caráter experimental (Miner et al., 2005; Reitzel e Heyland, 2007; Smith et al., 2007).

A extensa abrangência geográfica de C. subdepressus (costa leste das Américas, entre os trópicos) e a facilidade na obtenção de gametas, tornam a espécie interessante para estudos de desenvolvimento. Além disso, é congenérica de C. rosaceus¹, espécie com larva planctotrófica facultativa, ampliando possibilidades de estudos comparados, como

¹Através da análise da citocromo oxidase I, Zigler et al. (2008) revelaram que C. subdepressus e C. rosaceus não são espécies irmãs e divergiram entre 7 e 8 milhões de anos atrás. C. europacificus mostrou-se mais próxima de C. subdepressus, tendo divergido em torno de 3 milhões de anos atrás.

ocorre com as espécies Heliocidaris erythrogramma e H. tuberculata (Wray, 1995).

Deste modo, a descrição abaixo fornece informações básicas da morfologia e padrões do desenvolvimento de *C. subdepressus*, complementando as informações existentes na literatura sobre o desenvolvimento larval e acrescentando outras inúmeras, especialmente quanto ao desenvolvimento pós-metamórfico dos jovens.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Coleta dos adultos

Coletamos indivíduos adultos de *Clypeaster subdepressus* por meio de mergulho livre em três localidades do Canal de São Sebastião: Praia Preta (23° 49' 10" S; 45° 24' 37" W), Portinho (23° 50' 25" S; 45° 24' 22" W) e Parcel da Praia Grande (23° 50' 59" S; 45° 24' 59" W) (Figura 2.1). Os locais apresentam longas extensões de cascalho, habitat preferencial de *C. subdepressus*, e profundidade adequada para mergulho livre, variando entre 3 e 5 m. No Portinho e Parcel há abundância de espécimes, mas a densidade populacional não é alta. Embora as bolachas-do-mar estivessem semi-enterradas com a superfície aboral recoberta de cascalho, eram facilmente reconhecidas pela forma e rastro deixado pelo seu deslocamento no substrato. Coletamos os exemplares manualmente e os transportamos para o laboratório em caixas plásticas com água do mar. Sacos plásticos colocados entre os indivíduos evitaram danos à superfície do corpo decorrente do atrito entre os animais durante o transporte.

Coletamos em torno de quinze espécimes mensalmente, de dezembro de 2006 a novembro de 2007 (n = 256). Todos os indivíduos coletados tiveram a superfície oral e aboral fotografada (Figura 2.2). Em laboratório, os espécimes foram mantidos em tanques de 500 L com água do mar corrente e substrato retirado do local da coleta.



Figura 2.1: Locais de coleta de *C. subdepressus* adultos no Canal de São Sebastião. CEBIMar-USP localizado no marco azul. (Imagem: Google Maps)



Figura 2.2: Adulto de *C. subdepressus* mostrando o sistema de classificação das áreas ambulacrais (numerais romanos) e interambulacrais (numerais arábicos).

2.2.2 Obtenção dos gametas

Para induzir a liberação de gametas, injetamos 2 a 3 mL de KCl 0,53 M no celoma perivisceral com uma seringa de 5 mL, aplicada na metade do comprimento do sulco alimentar do ambúlacro III, de modo a evitar danos à asa externa da lanterna de Aristóteles (região central) e ao tubo digestório (periferia). Este procedimento é recomendável para *C. subdepressus*, pois o esqueleto no sulco alimentar é mais fino do que o de outras regiões do corpo. Além disso, as chances de danificar a lanterna de Aristóteles são menores, comparado a injeções orais de KCl (e.g., Strathmann, 1987). O sulco III foi escolhido arbitrariamente.

Após a primeira injeção colocamos as bolachas-do-mar com a face aboral para cima, em uma superfície seca, e observamos por cerca de três minutos. Caso a liberação dos gametas não ocorresse, uma segunda injeção de 2 mL era aplicada no sulco alimentar do ambúlacro III ou V. Durante a segunda injeção, o periprocto contraía e um jato de água era expelido pelo ânus, e, em quase todos os casos, a liberação de gametas se iniciava simultaneamente.

Com o início da liberação de gametas, o sexo dos indivíduos era imediatamente identificado. Colocamos os machos com a superfície aboral para baixo sobre cubetas secas e previamente resfriadas por cerca de 5 min, ou até que uma quantidade suficiente de esperma fosse liberado. As fêmeas também foram invertidas, mas sobre béqueres preenchidos com água do mar filtrada, de modo que o ápex ficasse submerso e os óvulos fossem liberados diretamente na água.

2.2.3 Fecundação

Passamos os óvulos por uma rede de 300 µm, no mínimo duas vezes, para retirar detritos e muco, e separar óvulos agregados devido à camada gelatinosa. Após a filtragem, os óvulos foram ressuspendidos num béquer de 500 mL com água do mar filtrada. Em outro recipiente diluímos uma gota de esperma em 50 mL de água do mar filtrada.

Adicionamos 1 mL da solução diluída de esperma ao béquer com os óvulos e homogeneizamos a solução. Dez minutos após a adição do esperma, examinávamos uma pequena amostra com os óvulos sob lupa ou microscópio a fim de identificar a elevação do envelope vitelínico nos óvulos, indicando que a fecundação havia ocorrido com sucesso. Caso um número baixo de óvulos estivesse fecundado adicionávamos outro mililitro da solução de esperma, com o cuidado de não aumentar muito a concentração de espermatozóides para evitar a poliespermia dos embriões.

A temperatura utilizada durante a fecundação foi de 26 °C.

2.2.4 Culturas

Embriões e Larvas

Transferimos os óvulos fecundados do béquer onde havia ocorrido a fecundação para um recipiente cilíndrico de vidro de 4,5 L, formando uma camada única de embriões no fundo. Até a eclosão das larvas, a alta concentração de embriões na cultura parece não influir no desenvolvimento dos mesmos. Verificamos, no entanto, que se as larvas não fossem separadas em culturas menos concentradas entre 12 e 24 h após a eclosão, havia mortalidade em massa. Assim, como as larvas recém eclodidas ficavam suspensas na coluna de água, o sobrenadante presente no recipiente de 4,5 L era separado em recipientes de 100 mL com água do mar filtrada e concentração aproximada de uma larva por mililitro. Testamos diversos tipos e tamanhos de recipientes durante a criação das larvas, mas béqueres e outros potes maiores do que 100 mL, mesmo com aeração, não mostraram-se adequados para o cultivo das larvas.

Fizemos a manutenção das culturas diariamente. Inicialmente, observávamos as condições da água e das larvas sob lupa. As larvas mortas eram facilmente reconhecidas por ficarem verdes e afundarem, e eram retiradas da cultura com uma pipeta Pasteur. Caso uma cultura apresentasse mortalidade em massa, as larvas saudáveis restantes eram transferidas para uma nova cultura. Trocávamos cerca de 80 % da água das culturas diCom o intuito de verificar se as larvas de *C. subdepressus* são capazes de se desenvolver sem alimento, um grupo experimental foi cultivado simultaneamente às demais, sem a adição de microalgas.

Como as larvas adquiriam a capacidade de se alimentar entre o segundo e terceiro dia, três dias após a fecundação passávamos a adicionar microalgas nas culturas. *Dunaliella* (cepa *Dun.ter. - CF*) e *Rhodomonas* (cepa *Rhodomonas sp. - USA*), provenientes do Laboratório de Cultura de Microorganismos do Instituto Oceanográfico, mostraram-se suficientes para o desenvolvimento das larvas de *C. subdepressus*. Mantivemos culturas desses microorganismos em garrafas plásticas de 600 mL dentro de câmara de cultura com ciclo de 12 : 12 horas e temperatura constante de 24 °C. Cerca de 50 mL era dosado da cultura e colocado em um recipiente de vidro, com o cuidado de não contaminar o bocal da garrafa. Antes de alimentar as larvas, fixávamos 10 mL da cultura de microalgas com uma gota de lugol e estimávamos a concentração de células utilizando uma câmara de Neubauer. Em seguida calculávamos o volume necessário de microalgas a ser adicionado em cada cultura de larvas, de modo a atingir uma concentração final entre 8×10^5 e 1×10^6 células/mL. As larvas foram alimentadas diariamente nas fases iniciais e a cada dois dias em estágios mais tardios.

Mantivemos as larvas em uma sala com temperatura controlada de 26 °C e iluminação natural. Separamos as larvas com rudimento bem desenvolvido para o procedimento de indução da metamorfose, onde uma pequena quantidade de cascalho do habitat dos adultos era adicionado ao recipiente. Larvas que iniciaram o processo de metamorfose foram mantidas no mesmo recipiente até o dia seguinte, sendo então transferidas às novas culturas descritas abaixo. Devolvemos larvas que não se metamorfoseavam às culturas originais.

Metamorfose

Highsmith (1982) verificou em laboratório que larvas competentes de *Dendraster excentri*cus (Clypeasteroida) realizam a metamorfose preferencialmente no substrato do habitat dos adultos. Verificou ainda que uma pequena quantidade de substrato dos adultos induz a metamorfose de larvas competentes (Highsmith, 1982; Strathmann, 1987). Utilizando a mesma metodologia, transferimos larvas de *C. subdepressus* com o rudimento bem desenvolvido para placas de petri com água do mar filtrada. Sob lupa, adicionamos alguns grãos de cascalho à placa. Gravamos em vídeo a metamorfose completa, desde os testes de substrato da larva até a regressão dos tecidos do jovem recém-metamorfoseado.

Jovens

Jovens colocados em cultura com substrato de areia fina apresentaram dificuldades na locomoção e alimentação. Por sua vez, jovens criados em culturas mistas, em que metade da placa continha cascalho e a outra metade, areia fina, permaneciam no cascalho. Deste modo, mantivemos os jovens em recipientes de 100 mL com um camada única de cascalho proveniente do habitat dos adultos. Trocamos a água das culturas uma vez por semana ou quinzenalmente, sendo os recipientes vedados com filme de PVC para minimizar a evaporação e conseqüente aumento da salinidade. Durante as trocas de água adicionávamos 3 mL de plâncton ou porções de biofilme extraídos de aquários, a fim de manter alimento disponível para os jovens, uma vez que não trocamos o substrato dessas culturas.

2.2.5 Cinética das clivagens

Realizamos um experimento de fecundação artificial para quantificar a cinética das clivagens iniciais, seguindo os procedimentos descritos em 2.2.3. A cada 20 min a solução era homogeneizada e uma alíquota de 3 mL era fixada em formol 4 %. Fizemos a última coleta 180 min após a fecundação. Posteriormente, contamos os embriões de cada amostra de acordo com o número de células.

2.2.6 Microscopia de luz

Colocamos os embriões e larvas entre lâmina e lamínula para exame ao microscópio ou lupa, sendo a lamínula apoiada sobre quatro pequenos suportes de massa de modelar, a fim de evitar o esmagamento da amostra. Separamos as larvas com uma pipeta, sob lupa, e as transferimos para a preparação posicionando a ponta da pipeta ao lado da lamínula até que a câmara formada entre a lâmina e lamínula estivesse preenchida com água. Este método evita a formação de bolhas e permite um controle maior do volume da amostra. Sob o microscópio, a altura da lamínula pode ser regulada pressionando a massa de modelar com uma pinça fina. As amostras também foram colocadas em placas Corning $35 \times 10 \text{ mm}$ para visualização na lupa.

Fizemos a documentação fotográfica e videográfica com uma câmera digital Nikon Coolpix 4500 e com uma filmadora digital Sony DCR HC1000, respectivamente, ambas acopladas no microscópio Zeiss Axioplan2 e estereomicroscópio Zeiss Stemi SV11 APO. Alguns videogramas foram capturados diretamente da câmera de vídeo conectada ao computador via porta *Firewire*.

A pequena profundidade de foco dos microscópios e o tamanho e forma dos embriões e larvas impede que toda a extensão dos espécimes seja observada num mesmo plano focal. Com o intuito de diminuir a perda de informação decorrente da captura de imagens, quando possível, tiramos fotografias seqüenciais em diversos planos focais da amostra. Este procedimento permitiu analisar as imagens de forma mais completa, uma vez que planos focais adjacentes eram visualizados e os limites de estruturas ficavam mais evidentes. Além disso, a técnica possibilita reconstruir tridimensionalmente as imagens das larvas e embriões obtidas *in vivo*, preservando detalhes de sua morfologia-funcional.

Examinamos jovens de *C. subdepressus* sob microscopia de luz polarizada, o que permitiu visualizar o esqueleto calcário, inclusive os rudimentos da lanterna de Aristóteles, com os espécimes vivos. Observamos uma pequena amostra com larvas de 48 hpf no microscópio confocal do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan.

2.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

Larvas com 4 e 36 hpf fixadas em glutaraldeído 2 % foram desidratadas em série alcoólica até álcool 100 %. Para facilitar o procedimento de desidratação e evitar a perda de material, larvas e embriões foram transferidos ao longo da série alcoólica dentro de pequenas câmaras (tubo Eppendorf adaptado, fechado nas duas extremidades com redes de malha de 60 µm). Os procedimentos-padrão de ponto crítico e metalização foram realizados no Instituto de Biociências da USP. As amostras foram observadas no Centro de Microscopia Eletrônica do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP e no Museu de Zoologia da USP.

2.3 Resultados

2.3.1 Liberação dos gametas

A liberação dos gametas acontece cerca de 2 a 3 min após a injeção da solução de KCl ou imediatamente após a segunda injeção. É comum apenas uma ou duas gônadas liberarem gametas. Machos e fêmeas de *Clypeaster subdepressus* apresentam cinco gonóporos onde cada abertura está associada a uma longa papila genital tubular (Figura 2.3a-c). Não observamos diferenças entre as papilas genitais dos dois sexos. Além da abertura principal, alguns indivíduos apresentam pequenas papilas genitais acessórias adjacentes ao gonóporo (Figura 2.3b). A um único gonóporo podem estar associadas até três papilas acessórias, e este número pode variar entre gonóporos de um mesmo indivíduo. A observação de um indivíduo macho durante a liberação de gametas mostrou que as papilas podem ser funcionais, apesar de o fluxo de gametas ser baixo comparado à papila principal.



Figura 2.3: Liberação de gametas de *C. subdepressus* através de papilas dos gonóporos. (a) Cinco papilas (seta) visíveis entre os espinhos no ápex (superfície aboral). (b) Papila principal de um indivíduo macho e papila acessória adjacente (seta). (c) Papila principal de uma fêmea liberando óvulos. (d) Desova espontânea de gametas em março de 2007.
Durante a liberação, a pressão hisdrostática exercida pelo fluxo de saída dos gametas faz com que a papila principal fique ereta e eleve-se acima dos espinhos. Com isso, a maioria dos gametas é liberada diretamente na coluna d'água e não entre os espinhos. A liberação dos gametas pode se estender por cerca de meia hora, de forma quase contínua, mas com variações na intensidade do fluxo. O fluxo estimado, a partir de tomadas de vídeo, pode variar entre 7 e 120 óvulos por segundo.

Realizamos seis fecundações *in vitro* entre os meses de janeiro e março de 2007, quando a grande maioria dos indivíduos injetados com KCl liberaram gametas. Em setembro de 2006, durante os pilotos, três machos e uma fêmea liberaram pequenas quantidades de gametas, suficientes para serem fecundados. No entanto, a maioria dos embriões estava sem a membrana de fecundação (envelope vitelínico estendido e endurecido) durante as clivagens, e as larvas morreram ainda no primeiro dia de vida. Uma tentativa de fecundação em julho de 2007 não foi bem sucedida: das 14 bolachas coletadas, apenas dois machos liberaram espermatozóides, nenhum exemplar tendo liberado gametas femininos.

No dia 8 de março de 2007, aproximadamente às 17 h 30 min, cinco indivíduos que estavam sendo mantidos nos tanques com água do mar corrente iniciaram a liberação sincronizada de gametas. No habitat natural, as bolachas são normalmente encontradas semi-enterradas ou enterradas com sua região aboral recoberta por pelo menos uma fina camada de cascalho, o mesmo ocorrendo com os exemplares mantidos nos tanques. No episódio de desova observado, os grãos de areia que recobriam a região genital (ápex) foram afastados radialmente da superfície aboral (Figura 2.3d), e a liberação dos gametas se iniciou pelos cinco gonóporos. A liberação encerrou-se após cerca de 10 minutos, quando a região genital voltou a ser recoberta pelo cascalho. O ciclo se reiniciou após alguns minutos, mas não observamos o número de vezes que pode se repetir em cada indivíduo.

2.3.2 Gametas

Os óvulos de *C. subdepressus* são esféricos (Figura 2.4a) ou levemente elípticos (Figura 2.4b), translúcidos e brancos. Apresentam diâmetro médio de 160 µm. O núcleo cercado de conteúdo citoplasmático é visível sob microscopia de luz. O envelope vitelínico na superfície do óvulo apresenta um aspecto rugoso (Figura 2.4d). Filmagens aceleradas dos óvulos maduros revelam que suas partículas citoplasmáticas estão em constante movimento, aparentemente aleatório, mas suas trajetórias não foram analisadas.

Ao sair do gonoduto, o esperma é branco e bastante denso. Os espermatozóides são compostos por 3 regiões distinguíveis sob microscopia óptica: cabeça, peça intermediária e flagelo (Figura 2.4b). A cabeça é cônica, embora cerca de 30% dos espermatozóides recém liberados apresentassem cabeça arredondada. A cabeça mede cerca de 2,9 µm de comprimento, a peça intermediária 1,3 µm e o flagelo cerca de 43 µm.

2.3.3 Fecundação

Os dados do desenvolvimento de C. subdepressus da fecundação até a eclosão estão resumidos na Tabela 2.1.

Capturamos os eventos desencadeados logo após a fecundação em vídeo por três vezes, mas em nenhuma das tomadas foi possível identificar o espermatozóide penetrando no óvulo. Analisamos a dinâmica da elevação do envelope vitelínico, que marca o início dos processos de desenvolvimento do embrião: após a entrada do espermatozóide, o envelope leva de 30 a 40 s para separar-se do óvulo e entre 2 e 6 min para se estender por completo (Figura 2.5). Após sua elevação completa o envelope endurece criando uma barreira física contra a poliespermia, e passa a ser denominado membrana de fertilização. A elevação do envelope se inicia no ponto onde o espermatozóide penetrou o óvulo e se propaga corticalmente até a região diametralmente oposta. Este movimento provoca a deformação da superfície do óvulo, que por sua vez volta a assumir a forma esférica assim que toda a extensão do envelope se separa.



Figura 2.4: Aspecto geral dos gametas de *C. subdepressus* observados sob microscopia de luz. (a) Óvulo esférico com núcleo na porção central. (b) Espermatozóides maduros e imaturos (seta) liberados após a injeção de KCl. (c) Óvulo elíptico. (d) Aspecto rugoso da superfície do óvulo não fecundado.



Figura 2.5: Seqüência de vídeo mostrando a elevação do envelope vitelínico após a entrada do espermatozóide (0s). Seta indica o ponto de entrada do espermatozóide.

Estruturas/Eventos	Tempo após fertilização
Entrada do espermatozóide	0
Elevação do envelope vitelínico	30 a 40 s
Membrana de fertilização	$2 \ge 6 \min$
Início da migração dos pró-núcleos	$5\mathrm{min}$
Fusão dos pró-núcleos	$18 \min$
2 células (95,8 %)	$80 \min$
4 células $(87,9\%)$	$100 \min$
8 células $(74, 4\%)$	$120 \min$
16 células $(87,5\%)$	$160 \min$
32 células $(91,\!4\%)$	$180 \min$
56 células	$3\mathrm{h}$
60 células	$3 h 15 \min$
108 células	3 h 30 min
Formação da blástula	$3\mathrm{h}$ $30\mathrm{min}$ a $8\mathrm{h}$
Espessamento do pólo vegetativo	$7\mathrm{h}$ $30\mathrm{min}$ a $10\mathrm{h}$
Cílios	7 h 30 min
Eclosão	8 h

Tabela 2.1: Desenvolvimento de C. subdepressus da fecundação à eclosão.

Cerca de 5 min após a entrada do espermatozóide, o pró-núcleo masculino inicia sua migração da região periférica do óvulo até o centro, onde se encontra o pró-núcleo feminino. Este movimento leva cerca de 12 min 30 s e ocorre em velocidade constante de $0,1 \,\mu\text{m/s}$. O pró-núcleo masculino é empurrado em direção ao centro do óvulo pelos filamentos de microtúbulos do centrossomo que o cercam (Figura 2.6). Durante a migração do pró-núcleo masculino, o pró-núcleo feminino, que encontra-se deslocado do centro, move-se rapidamente para a região central do óvulo (Figura 2.6).

A fusão dos pró-núcleos ocorre no centro da célula e é acompanhada de fluxo intenso de material citoplasmático. Além dos microtúbulos, outro tipo de movimento foi revelado após acelerarmos o vídeo original 625×. Nessa velocidade, a superfície do zigoto começa a vibrar após a fusão dos pró-núcleos e cessa subitamente antes da primeira divisão. A vibração evidenciada pelo vídeo acelerado parece ser decorrente de pequenas deformações na superfície do zigoto que deixam-no com aparência irregular.



Figura 2.6: Montagem mostrando a migração e fusão dos pró-núcleos feminino (verde) e masculino (vermelho) durante $12 \min 30$ s.

Imediatamente antes da primeira clivagem, a camada hialina torna-se mais espessa. Essa camada surge concomitantemente à elevação da membrana de fecundação e forma uma grossa matriz extracelular ao redor do óvulo (Figura 2.7).

2.3.4 Clivagens

Todas as clivagens do desenvolvimento de *C. subdepressus* são holoblásticas. As duas primeiras são meridionais, isto é, ocorrem ao longo do eixo animal/vegetal (A /V) e dividem o embrião em quatro blastômeros de tamanhos iguais (Figura 2.8, exceto f). A terceira clivagem é equatorial, isto é, perpendicular ao eixo A /V, originando 8 blastômeros e separando dois pólos de quatro células cada (Figura 2.8f e 2.9a). É possível distinguir o pólo animal do vegetativo, pois existe uma ligeira diferença de tamanho entre cada grupo de blastômeros, sendo as células do pólo vegetativo (macrômeros) cerca de 30 % menores que as células do pólo animal (mesômeros). A quarta divisão é determinante na diferenciação das linhagens celulares. No pólo animal, a clivagem é meridional e deslocada 45 ° do plano da segunda divisão, originando 8 blastômeros iguais, denominados mesômeros (Figura 2.9f). No pólo vegetativo, entretanto, a clivagem que origina os



Figura 2.7: Membrana hialina sob microscopia eletrônica de varredura em embriões de 4 h após a fertilização. (a) Blastômeros envolvidos pela membrana hialina (mais clara). (b) Detalhe de (a) mostrando a superfície da membrana plasmática da célula (visível devido ao rompimento da membrana hialina durante a preparação). (c) Membrana hialina recobrindo toda o embrião. (d) Embrião fraturado mostrando o limite da membrana hialina (setas).

macrômeros e micrômeros é equatorial e desigual, posicionando-se à 45° do eixo A/v (Figura 2.9b,c,e).

Os micrômeros são as primeiras células onde a adesão celular torna-se evidente. Logo após seu surgimento, as membranas dos micrômeros começam a se unir fazendo com que estas células percam sua forma esférica e se posicionem em roseta (Figura 2.9e). Contudo, após a clivagem seguinte, a forma original é recuperada. A adesão celular parece ser mais pronunciada nos micrômeros e nas células derivadas, em comparação com as outras células do embrião.

A formação do embrião de 32 células inicia-se com a divisão equatorial dos mesômeros e divisão meridional dos macrômeros, cujo plano de divisão está alinhado com o plano da quarta divisão que originou os mesômeros. Simultaneamente, os micrômeros começam a dividir-se, mas de forma seqüencial e no sentido anti-horário, de modo que o término das clivagens ocorra cerca de 6 min após o final da divisão dos mesômeros e macrômeros (Figura 2.10a,b). É nesta fase que a organização espacial das células forma o que será a blastocele do embrião (Figura 2.10c).

A partir desse momento, todas as células próximas ao pólo vegetativo, com exceção dos 8 micrômeros, se dividem no plano equatorial. Por alguns momentos, o embrião permanece com 56 células (Figura 2.10f) até que os 4 micrômeros maiores dividam-se meridionalmente, adicionando mais 4 células. A clivagem subseqüente (sétima clivagem) dos macrômeros e mesômeros também ocorre sem a participação dos micrômeros, formando um embrião com 108 células (Figura 2.11a). Depois deste estágio, é difícil visualizar com clareza as linhagens celulares sem utilizar métodos mais sofisticados, pois as células podem mudar de posição. Muitos embriões apresentaram variações nos planos de divisão das células, especialmente a partir da terceira clivagem.

A partir da sexta clivagem, são reconhecíveis dois grupos distintos de células no embrião. As células oriundas dos macrômeros e mesômeros, que mantêm sua forma esférica, e uma placa compacta de células no pólo vegetativo (Figura 2.11b-d).



Figura 2.8: Primeiras clivagens de *C. subdepressus* sob microscopia de luz. (a) Cariocinese mostrando os 2 núcleos e áster de microtúbulos. (b) Primeira clivagem meridional.
(c) Momentos antes da segunda clivagem; núcleos alinhados e membrana hialina (seta).
(d) Segunda clivagem meridional. (e) Embrião com 4 blastômeros. (f) Embrião com 8 blastômeros originados por uma clivagem equatorial (vista do pólo animal).



Figura 2.9: (a) Embrião com 8 células, vista lateral; blastômeros do pólo animal (acima) e vegetativo (abaixo) têm tamanhos diferentes. (b) Formação dos micrômeros no pólo vegetativo através de uma divisão desigual. (c) Embrião com 16 células ao fim da divisão meridional dos mesômeros. (d) Embrião com 16 células em vista lateral. (e) Micrômeros e macrômeros no pólo vegetativo. (f) Disposição dos mesômeros no pólo animal.



Figura 2.10: (a) e (b) Final da divisão dos micrômeros (seta) e macrômeros formando embrião com 32 células; vista do pólo vegetativo. (c) Embrião com 32 células mostrando início da blastocele; vista lateral. (d) Pólo animal do embrião com 32 células. (e) Pólo vegetativo do embrião com 56 células. (f) Divisão equatorial dos macrômeros e mesômeros formando embrião com 56 células, sob MEV.



Figura 2.11: Formação da placa vegetativa. (a) Pólo vegetativo de um embrião com 108 células. (b) Vista lateral de um embrião mostrando a diferenciação do pólo vegetativo (seta), onde encontram-se os micrômeros. (c) e (d) MEV mostrando a adesão dos micrômeros na placa vegetativa formada no pólo vegetativo.

A análise da cinética das clivagens mostrou que os primeiros embriões realizam a primeira divisão 60 min após a fecundação e em 80 min a maioria (96%) encontra-se com 2 células. Após 100 min, 88% dos embriões estão com 4 células e aparecem os primeiros com 8 células; em 120 min, 74% têm 8 células, e o predomínio após 160 min é de embriões com 16 células (87%). Após 180 min os embriões com 32 células predominam 91%. O ciclo de divisões a partir da primeira clivagem dura aproximadamente 20 min. Cerca de 96% dos óvulos foram fecundados (Figura 2.12).



Figura 2.12: Proporção de embriões com diferentes números de células durante as clivagens. Amostras foram colhidas a cada 20 min após a fecundação.

2.3.5 Blástula

À medida que as clivagens ocorrem, as células diminuem de tamanho, perdem sua forma esférica e adquirem aspecto poligonal. O embrião torna-se mais compacto e a blastocele mais definida entre 3,5 h e 6,5 h (Figura 2.13). A blástula, composta por uma camada de células (ectoderme), passa por processos cruciais de seu desenvolvimento por volta de 7,5 h após a fertilização. A partir desse momento, ocorre a consolidação do epitélio, a diferenciação da placa vegetativa, a formação de cílios e a eclosão da blástula (Figura 2.14d).

Com a formação do epitélio, a taxa de clivagens diminui. Durante esse período, os primeiros cílios começam a aparecer no epitélio e em menos de 30 min a blástula começa a se mover dentro da membrana de fertilização. Concomitantemente ao aparecimento dos cílios, inicia-se o espessamento da placa vegetativa, que corresponde à região posterior da futura larva, onde ocorrerá a invaginação do arquêntero (Figura 2.14a-c). Ao eclodir, sua locomoção é rotatória e direcional, podendo ocorrer a reversão do movimento ciliado.

Consideramos que o estágio larval de C. subdepressus situa-se entre a eclosão e a metamorfose.

2.3.6 Gástrula

Os dados do desenvolvimento de *C. subdepressus* da eclosão até a metamorfose estão resumidos na Tabela 2.2.

Cerca de 10 h após a fertilização, as células mesenquimais primárias (CMP) iniciam sua ingressão na blastocele a partir do pólo vegetativo (Figura 2.15a). Estas células perdem o formato colunar, tornando-se aproximadamente esféricas, e agregam-se de forma unipolar no piso da cavidade do pólo vegetativo (Figura 2.15b-e). Aproximadamente 1 h depois do posicionamento das CMP, forma-se uma concavidade no pólo vegetal que assemelha-se ao início da invaginação do arquêntero (Figura 2.15c). No entanto, o início da invaginação somente foi visualizado 14 h após a fertilização.

Cílios distribuem-se em toda a extensão do epitélio da blástula, havendo no pólo anterior a diferenciação de um conjunto de cílios longos, denominado tufo apical, e no pólo vegetativo, um pequeno anel ciliado (Figura 2.19).

As CMP migram através da parede interna da blastocele, formando um anel no quarto



Figura 2.13: Compactação das células ectodérmicas entre 3,5 e 6,5 hpf, durante a formação da blástula. (a), (c) e (e) Plano focal na superfície mostrando a compactação das células. (b), (d) e (f) Aspecto geral da blástula durante este processo.



Figura 2.14: Diferenciação da blástula e eclosão. (a) Início do espessamento da placa vegetativa (seta). (b) Prolongamentos celulares supostamente envolvidos no espessamento (seta). (c) Etapa intermediária onde a região mais central (seta) ainda não aumentou sua espessura. (d) Eclosão da blástula através do rompimento da membrana de fertilização (seta); ocorre cerca de 8 hpf.



Figura 2.15: Ingressão das células mesenquimais primárias. (a) Seqüência mostrando o aspecto geral da blástula durante a ingressão das CMP. (b) Primeiras CMP a ingressar na blastocele. (c) Posicionamento unipolar das CMP durante a ingressão; pequeno abaulamento na placa vegetativa (seta). (d) Após ingressão, as CMP começam a migrar pela blastocele. (e) Visão do pólo vegetativo com as CMP na região central.

_

_

$\operatorname{Estruturas}/\operatorname{Eventos}$	Tempo após fertilização
CMP	10 h
Células com grânulos vermelhos	12 h
CMS	13 h
Invaginação do arquêntero	14 h a 24 h
Esqueleto larval	14 h
Prisma	24 h
Celomas	24 h
Tubo digestório tripartido	24 h
Plúteos 2 braços	48 h a 4 d
Início da alimentação	3 d
Plúteos 4 braços	4 d a 6 d
Abertura do hidróporo	$5\mathrm{h}$
Vestíbulo	6 d a 10 d
Plúteos 6 braços	6 d a 10 d
Plúteos 8 braços	10 d a 23 d
Rudimento	$10{\rm d}$ a $23{\rm d}$
Metamorfose	23 d

Tabela 2.2: Desenvolvimento de C. subdepressus da gastrulação à metamorfose.

mais posterior da larva, onde será produzido o esqueleto (Figura 2.16a). Essas células permanecem conectadas por pseudópodes filopodiais e se espalham para a região mais anterior da larva durante a gastrulação.

Células com pigmentos vermelhos diferenciam-se no epitélio da larva na região posterior (pólo vegetativo) 12 h após a fecundação, e migram junto com as CMP em direção ao pólo animal, mas ao longo do epitélio, durante a décima terceira hora (Figura 2.16b).

Após a ingressão das CMP, a placa vegetativa volta a assumir um aspecto relativamente uniforme, com uma camada de células colunares (Figura 2.17). Todavia, imediatamente antes da invaginação, estas células voltam a modificar sua morfologia projetando-se na direção da cavidade. Nesse momento, é possível flagrar as primeiras células mesenquimais secundárias (CMS) na blastocele (Figura 2.16d).

Por volta de 14 hpf, a invaginação do arquêntero aparece no pólo vegetativo e estendese pelo eixo ^A/v através da blastocele até tocar a região anterior. Durante o processo, que



Figura 2.16: Movimentos celulares relativos ao início da gastrulação. (a) CMP na parede interna da blastocele. (b) Células com pigmentos vermelhos na ectoderme na mesma altura das CMP. (c) Primeiras CMS ingressando na blastocele (seta). (d) Invaginação inicial do arquêntero e CMS emergindo de sua extremidade. (e) Agregados de CMP onde ocorre a formação do esqueleto larval (setas). (f) Detalhe da primeira espícula em formação, cercada por CMP.



Figura 2.17: Detalhe das células colunares (cc) presentes no pólo vegetativo durante a gastrulação sob MEV. **bc**, blastocele.

dura cerca de 6 h, uma série de movimentos celulares acontece na larva. Na décima quinta hora, nota-se que o anel formado pelas CMP apresenta um número maior de células, que formam então dois agregados na parede lateral da blastocele (Figura 2.16e). Entre as células de cada um destes agregados identificamos uma minúscula espícula calcária trirradiada, primórdio do esqueleto da larva (Figura 2.16f).

As CMS emergem da ponta do arquêntero durante toda gastrulação povoando a blastocele. Diferentemente das CMP, as CMS parecem ser compostas por diversos tipos celulares. Foram observadas células maiores com um grande número de pseudópodes filopodiais e lobópodes, células amebóides sem projeções, células menores com aparência rugosa e células com grânulos vermelhos (Figura 2.16d).

Após 16,5 h, as primeiras CMS tocam a região anterior da gástrula (Figura 2.18a,b). Até a décima nona hora, as células vermelhas do epitélio atingem o pólo anterior, e a blastocele encontra-se povoada pelas CMS. Nesse momento, as CMP continuam agrupadas em volta das duas espículas do esqueleto que estão com tamanho $3\times$ maior que 15 hpf (Figura 2.18c).

Algumas CMS na extremidade do arquêntero permanecem em contato direto com o epitélio, no final do processo de invaginação (Figura 2.18a-c). A partir desse evento, a larva inicia uma série de alterações morfológicas em seu plano corpóreo. A região onde encontram-se as espículas cresce em direção perpendicular ao arquêntero, enquanto a região anterior da larva curva-se na mesma direção.

O curto período entre o fim da invaginação e a curvatura da larva é denominado prisma, devido à forma prismática assumida pela larva nesse estágio (Figura 2.18e e 2.19). Uma visão do pólo vegetativo revela que o anel formado pelas CMP continua coeso (Figura 2.18f). Células com grânulos vermelhos cobrem toda a superfície da larva, exceto a parte ventral. A partir dessa etapa, o esqueleto apresenta ornamentações mais complexas, como o padrão fenestrado presente nos primórdios dos braços pós-orais que começam a se desenvolver (Figura 2.18g).

2.3.7 Plúteos

A larva plúteos, também denominada equinoplúteos, é uma etapa característica do ciclo de vida de equinóides, que em *C. subdepressus* apresenta 2, 4, 6 e finalmente 8 braços ao longo de seu desenvolvimento (Figura 2.20). Os pares de braços recebem denominação específica (ver Figura 2.21) e são essenciais para a biologia de larvas planctotróficas, participando da alimentação e locomoção da larva. A larva plúteos apresenta regiões especializadas com alta densidade de cílios, denominadas bandas ciliadas. Estas bandas estendem-se ao longo dos braços da larva criando micro-correntes que conduzem o alimento à boca e geram a força propulsora da locomoção.

A diferenciação da larva plúteos de *C. subdepressus* tem início com a curvatura da região anterior do prisma (descrito acima) e com o crescimento do primeiro par de braços, os braços pós-orais. O blastóporo que antes estava posicionado numa região posterior terminal (pólo vegetativo) assume uma posição dorsal intermediária (não-terminal). Por



Figura 2.18: Gastrulação e formação do prisma. (a) e (b) CMS tocam o teto da cavidade (seta). (c) Início da forma prismática da larva. (d) Agregados de CMP secretando o esqueleto larval. (e) Blastóporo da larva (seta preta), tufo apical (seta branca) e curvatura do assoalho ventral (cabeça-de-seta branca). Foto: Inácio D.S. Neto. (f) Anel de CMP no pólo vegetativo durante secreção do esqueleto. (g) Celomas evaginando do arquêntero (seta preta); braços pós-orais com esqueleto fenestrado (seta branca).



Figura 2.19: Larva de *C. subdepressus* no estágio de prisma. Na porção anterior encontrase o tufo apical (\mathbf{ta}) e a depressão onde será formada a boca (\mathbf{bo}). Na região posterior crescem os braços pós-orais (\mathbf{po}) e o futuro ânus (\mathbf{an}).



Figura 2.20: Estágios de maturação da larva plúteos de *C. subdepressus*. (a) Larva com 2 braços pós orais (setas; fora do foco). (b) Formação dos braços ântero-laterais (setas). (c) Braços póstero-dorsais (setas pretas) e forquilha dos braços pré-orais presente (seta branca). (d) Plúteos com 8 braços mostrando os braços pré-orais (setas).

sua vez, os braços pós-orais iniciam seu crescimento posicionados perpendicularmente ao eixo ^A/v da gástrula, crescendo a partir da face ventral, futura região anterior. A boca também se abre na face ventral da larva voltada para a direção do movimento. Essas alterações morfológicas modificam o plano de locomoção da larva e sua hidrodinâmica na transição de prisma para plúteos.



Figura 2.21: Reconstrução de uma larva plúteos com a identificação dos 4 pares de braços. Vista anterior.

Nos potes de cultura, as larvas deslocavam-se na vertical sempre com braços apontados para a superfície (região anterior). A ascensão na coluna d'água é realizada pelo batimento ciliar que resulta num movimento rotatório excêntrico no sentido horário, fazendo com que a larva ascenda numa espiral. Ao tocar a superfície, a larva parece cessar ou reverter o batimento ciliar, afundando lentamente, sem movimento rotatório e sempre com os braços apontados para a superfície. Muitas vezes as larvas ficam por algum tempo com os braços encostados na superfície antes de descer. Durante a subida ou descida, as larvas podem mudar de direção rapidamente.

Em menos de 48 hpf, dois espaços celômicos estão formados e posicionados nas laterais

do esôfago (Figura 2.22a e 2.23). Os braços pós-orais apresentam comprimento igual ao do corpo; boca e ânus não são funcionais. Tentativas de alimentar as larvas mostraram que os braços são capazes de criar correntes que direcionam as algas até a abertura oral, mas uma corrente contrária naquela região parece repelir qualquer partícula que se aproxime. O tubo digestório apresenta sinais de diferenciação em três regiões, esôfago, estômago e intestino (Figura 2.22a). A musculatura do esôfago e boca começa a se contrair 70 hpf; o estômago cresce em diâmetro, enquanto seu epitélio fica mais delgado. A partir do terceiro dia de vida, o tubo digestório torna-se funcional e as larvas começam a se alimentar (Figura 2.22b).

O esqueleto dos braços ântero-laterais, segundo par de braços a crescer, é formado por um eixo simples, não-fenestrado como nos braços pós-orais. Seu crescimento ocorre acima da região oral, sendo responsável por projetar a boca anteriormente, formando o lobo oral. Os primórdios dos braços póstero-laterais são visíveis após 4 d, sendo possível identificar seu padrão fenestrado. Ao mesmo tempo, os braços pré-orais, compostos por um eixo simples, surgem a partir de uma forquilha localizada acima do esôfago. Essa forquilha cresce anteriormente num ângulo aproximado de 45 ° com os braços ântero-laterais, formando as espículas denominadas arcos dorsais. Ao longo de seu desenvolvimento, os arcos dorsais posicionam-se abaixo dos braços ântero-laterais, passando a sustentar o lábio da boca (banda ciliada presente na porção mais anterior do lobo oral).

Em *C. subdepressus*, o hidróporo se forma acima da intersecção entre o esôfago e o estômago (denominada esfíncter cardíaco), aproximadamente 3 d após a fertilização. Trata-se de uma projeção de um dos espaços celômicos do lado esquerdo que contorna a parte posterior do esôfago formando um canal, que se abre no epitélio ao redor do quinto dia (Figura 2.22c,d).

O vestíbulo surge como uma invaginação do epitélio da larva entre 4 e 5 d, sempre do lado esquerdo, no espaço entre os braços pós-oral e póstero-dorsal e a boca (Figura 2.24a). Essa invaginação avança pelo mesênquima até tocar o celoma esquerdo (Figura 2.24b). É



Figura 2.22: Formação dos celomas, sistema digestório e hidróporo. (a) Detalhe dos celomas (setas) ao lado do arquêntero 48 hpf. (b) Tubo digestório diferenciado, boca (asterisco), esôfago, esfíncter cardíaco (seta) e estômago, após 3 d. (c) Início da formação do hidróporo através da extensão de células do celoma (seta) 48 hpf. (d) Hidróporo desenvolvido 3 d após fecundação.



Figura 2.23: Celomas de larva plúteos de 48 hpf sob microscopia confocal. **ce**, celoma; **bo**, boca; **esf**, esôfago; **est**, estômago.

a fusão do vestíbulo e do celoma esquerdo que formará o rudimento, conjunto de tecidos que se desenvolverá no adulto (Figura 2.24c,d). A fusão ocorre pela formação de projeções intercaladas entre o celoma e o vestíbulo que mais tarde conterão as primeiras espículas do esqueleto. Estas projeções formarão os espinhos, placas ósseas e pés ambulacrais da jovem bolacha (Figura 2.25a,b). Ao longo do processo, diversos tipos celulares estão presentes no rudimento. O aumento de tamanho do rudimento desloca o tubo digestório para a direita e a larva fica mais pesada, locomovendo-se mais vagarosamente. A maturação dos espinhos e pés ambulacrais ocorre ainda dentro da larva, sendo possível vê-los se movimentando poucos dias antes da metamorfose. Neste estágio, a superfície oral do rudimento está bem diferenciada com espinhos e pés ambulacrais, enquanto na superfície aboral do rudimento são distinguíveis apenas um tecido mais claro e algumas células com grânulos vermelhos. O rudimento de algumas larvas posicionava-se a aproximadamente 45 ° do eixo ^{ântero}/posterior da larva (Figura 2.25c).

Jejum

O desenvolvimento das larvas mantidas em jejum foi idêntico ao das larvas alimentadas até a primeira semana, considerando as estruturas formadas e seu tempo de desenvolvimento. Notamos diferenças somente durante a invaginação do vestíbulo. Enquanto nas larvas alimentadas o vestíbulo invaginou até o celoma, o vestíbulo de larvas em jejum não passou da invaginação inicial e as larvas morreram após 17 d de vida.

2.3.8 Metamorfose

O diâmetro do rudimento e o comportamento da larva são indicativos de que o plúteos tem potencial para metamorfosear. Larvas com rudimento bem desenvolvido apresentam um comportamento de "teste de substrato": deslocam-se para o fundo e se locomovem tocando o substrato com os braços larvais. A larva pode mover os braços para trás cerca de 90° e afastar o lobo oral para a direita, onde de um a três pés ambulacrais se projetam



Figura 2.24: Formação do vestíbulo e rudimento na larva de 5 d. (a) Invaginação do vestíbulo (seta). (b) Detalhe do vestíbulo tocando o celoma esquerdo. (c) Fusão do celoma e vestíbulo. (d) Início do desenvolvimento do rudimento.



Figura 2.25: Desenvolvimento do rudimento. (a) Início da formação de espículas nos tecidos do rudimento (seta). (b) Detalhe do rudimento com espinhos já diferenciados (seta). (c) Região posterior da larva mostrando o rudimento diferenciado, ocupando boa parte do corpo larval.

pelo poro do vestíbulo, tocando o substrato (Figura 2.26a). A larva se locomove contra o substrato com os braços paralelos ao fundo até que um dos pés ambulacrais expostos se prenda firmemente ao fundo.

A larva pode expor a superfície oral do rudimento por completo, abrindo os braços cerca de 180°, até se posicionarem posteriormente (Figura 2.26b). Após permanecer aderida ao substrato por alguns minutos, a larva pode-se soltar e voltar a nadar, assumindo a conformação larval original, com os braços posicionados anteriormente. A seqüência de movimentos deste comportamento está na Figura 2.26c.



Figura 2.26: Comportamento de "teste de substrato" que precede a metamorfose. (a) Locomoção da larva com a região do vestíbulo exposta e pé ambulacral projetando-se (seta). (b) Larva totalmente evertida e fixada no substrato. (c) Seqüência de imagens selecionadas a partir de cenas de vídeo mostrando a eversão completa do rudimento da larva.

As metamorfoses observadas sempre ocorreram no período da manhã, após a adição do alimento ou do substrato dos adultos. Tentativas de induzir a metamorfose à tarde e durante a noite não tiveram sucesso.

Os comportamentos reversíveis descritos acima precedem a metamorfose *per se*, que é um processo irreversível, com duração aproximada de 1 h 30 min para *C. subdepressus*. Deste modo, só é possível distinguir uma larva em metamorfose de uma larva competente (que potencialmente pode iniciar a metamorfose) após o início da regressão do epitélio, como descrito a seguir.

A larva permanece aderida ao substrato pelo rudimento, com os braços posicionados para trás, quando o seu epitélio começa a regredir e acumular-se na superfície aboral do rudimento. A exposição das pontas do esqueleto dos braços indica que a metamorfose está ocorrendo. Durante a regressão, o epitélio pode se romper, liberando agregados de células vermelhas e outros tecidos que revestem os braços larvais. Enquanto isso, os pés e espinhos se movem ativamente, mas o jovem não muda muito de posição. Uma hora após o início da metamorfose, os espinhos que estão presos na superfície aboral perdem sustentação e começam a se desprender até caírem por completo. Em seguida, a superfície aboral assume forma esférica e o epitélio relativamente transparente que recobre a região central torna-se mais amarelado e concentra um maior número de células vermelhas (Figura 2.27). O processo desencadeia a reabsorção dos tecidos larvais e a diferenciação dos tecidos do adulto.

2.3.9 Jovem

Os dados do desenvolvimento juvenil de *C. subdepressus* a partir da metamorfose estão resumidos na Tabela 2.3.

Jovens recém metamorfoseados (Figura 2.28a,b) podem permanecer quase na mesma posição por cerca de 1 d, quando aderidos ao fundo de vidro dos potes de cultura. A maioria, no entanto, coloca-se entre os grãos do cascalho, ficando semi-enterrados. A



Figura 2.27: Metamorfose completa de $C.\ subdepressus$ com duração de 1 h $30\,{\rm min}.$

Tabela 2.3: Desenvolvimento do jovem pós-metamórfico de *Clypeaster subdepressus*.

Estruturas/Eventos	Tempo após metamorfose
Desenvolvimento das hemipirâmides	0 d a 2 d
Placas calcárias da superfície aboral	2 d
Diferenciação do tubo digestório	2 d a 7 d
Ornamentação dos dentes	4 d
Espinhos aborais (coroa)	4 d
Pirâmides	7 d
Boca e membrana peristomial	7 d
Início da alimentação	7 d
Pedicelárias oficéfalas	14 d
Pedicelárias tridentadas	30 d
Pirâmides Boca e membrana peristomial Início da alimentação Pedicelárias oficéfalas Pedicelárias tridentadas	7 d 7 d 7 d 14 d 30 d

simetria bilateral do jovem não é tão evidente até que a absorção dos tecidos larvais esteja completa (Figura 2.29), mas pode ser identificada pela disposição dos elementos da superfície oral sob microscopia de luz.

Os espinhos e pés ambulacrais dispõem-se em duas fileiras ao longo do âmbito do jovem, uma delas voltada para a região oral (infracoronal) e a outra para a superfície aboral (supracoronal). Na face oral, ocorrem 5 espinhos, um em cada área interambulacral, e um par de pés ambulacrais para cada zona ambulacral (Figura 2.28c). Em cada ambúlacro da superfície oral, estão presentes dois tipos de pés ambulacrais que diferem na sua porção terminal (Figura 2.28d). Um deles, que apresenta a extremidade expandida em uma ventosa que contém o ossículo do aro esquelético, parece participar principalmente da atividade locomotora, enquanto o segundo não apresenta expansão na extremidade, nem ossículo (Figura 2.30). O último tipo, é o pé que se projeta pelo vestíbulo durante o comportamento de "teste de substrato" das larvas pré-metamórficas. Entre cada par de pés ambulacrais, encontram-se os esferídios, espinhos modificados, fixos, com a ponta ovalada e refringente e diâmetro aproximado de 20 µm.

A fileira de espinhos da superfície aboral é composta por 10 espinhos organizados aos pares na área interambulacral e um pé com a extremidade expandida por zona ambulacral. Após a metamorfose, o jovem tem no total 15 espinhos e 15 pés ambulacrais. Sua superfície aboral ainda não possui esqueleto, mas remanescentes do esqueleto da larva que não foram reabsorvidos podem ser vistos abaixo do epitélio (Figura 2.28b).

O sistema digestório não está organizado e a boca só aparecerá cerca de uma semana após a metamorfose. Contudo, em microscopia de luz, utilizando luz polarizada, os rudimentos do esqueleto da lanterna de Aristóteles tornam-se visíveis. Cinco conjuntos de ossículos formam as pirâmides e dentes já no segundo dia após a metamorfose. Cada conjunto é composto por um dente na posição central (interambulacral), um par de hemipirâmides ao lado do dente, uma epífise ao lado de cada hemipirâmide e uma peça intermediária entre os conjuntos, o rudimento da rótula (Figura 2.31a).



Figura 2.28: Morfologia do jovem recém metamorfoseado de *C. subdepressus*. (a) Superfície aboral ainda com tecidos larvais. (b) Remanescentes do esqueleto larval na superfície aboral, sob luz polarizada. (c) Elementos da superfície oral com esferídios (seta), espinhos e pés ambulacrais (região anterior do lado esquerdo). (d) Pés ambulacrais presentes no jovem, com (seta) e sem (cabeça de seta) aro esquelético.



Figura 2.29: Jovem de C. subdepressus após a metamorfose. Superfície aboral rugosa, evidência da reabsorção dos tecidos larvais.



Figura 2.30: Pés ambulac
rais de ${\it C.\ subdepressus}$ sob MEV.
A partir do segundo dia, as hemipirâmides estão separadas apenas pelo espaço que dará origem ao canal dentário, onde encontra-se o dente (Figura 2.31b). O esqueleto das hemipirâmides é poroso e difere do dente, cujo esqueleto é sólido. Neste estágio, o dente tem uma ponta aguda e poucas ornamentações (Figura 2.31c), mas em 4 d após a metamorfose (dpm), torna-se robusto e com a superfície mais complexa (Figura 2.31d). Finalmente, por volta do sétimo dia pós-metamorfose os pares de hemipirâmides estão completamente fundidos em uma peça única, a pirâmide (Figura 2.31e). Durante este período nenhum outro elemento esquelético se forma na superfície oral do jovem.

Simultaneamente, o tubo digestório começa a se diferenciar e torna-se visível sob a superfície aboral no segundo dia. O tubo se inicia no esôfago, que sai da lanterna de Aristóteles ainda em formação, e projeta-se para o lado direito da cavidade celomática, continuando para a região anterior. O tubo posiciona-se então imediatamente abaixo do esqueleto da superfície aboral, contornando o corpo pelo lado esquerdo (anti-horário), passando pela região posterior, até chegar ao lado direito novamente. Nesse ponto, o tubo direciona-se para a parte posterior, abrindo-se na superfície aboral do jovem (Figura 2.32a).

A superfície aboral é ocupada por placas calcárias em 2 dpm (Figura 2.32b), exceto no local do ânus, onde está presente uma placa anal móvel. Entre o segundo e quarto dia, ocorre o crescimento de 8 espinhos nas regiões periféricas (próximas ao âmbito) da superfície aboral e cerca de 4 espinhos na parte central (Figura 2.32c). Estes são diferenciados pela extremidade em forma de coroa e por serem mais estáticos comparados aos outros espinhos (Figura 2.32d).

Após a abertura do ânus e formação da lanterna de Aristóteles, a membrana peristomial torna-se funcional e compõe a abertura da boca (Figura 2.33a e 2.34). A movimentação da musculatura circular é bastante ativa. Quando os jovens começam a se alimentar, 7 dpm, contrações peristálticas do esôfago são visíveis.

Os jovens de C. subdepressus têm preferência pelo cascalho do habitat dos adultos,



Figura 2.31: Formação da lanterna de Aristóteles. (a) Rudimentos da lanterna logo após a metamorfose (seta). (b) Hemipirâmides (setas) formadas, mas não fundidas; dentes pontiagudos (c). (d) Jovem com 4 d mostrando ornamentação complexa no dente. (e) Pirâmide (seta) formada no sétimo dia (hemipirâmides fundidas). (f) Detalhe do dente.



Figura 2.32: Estruturas da superfície aboral. (a) Tudo digestório (verde) e reto (vermelho) acabando no ânus (seta). (b) Esqueleto na superfície aboral 2 d após a metamorfose, sob luz polarizada. (c) Espinhos diferenciados na superfície aboral. (c) Detalhe do espinho com extremidade em forma de coroa (seta) e um espinho primário.



Figura 2.33: Membrana peristomial. (a) Visão lateral de um jovem com a membrana peristomial diferenciada (seta). (b) Superfície oral do jovem.



Figura 2.34: Superfície oral do jovem de *C. subdepressus* sob MEV. **bo**, boca; **ed**, espinho posterior; **ef**, esferídio.

em detrimento de areia fina. Assim como os adultos, os jovens parecem se alimentar de matéria orgânica depositada entre os grãos de areia do cascalho. Durante todas as observações, os jovens apresentavam partículas no sistema digestório e eventualmente no reto. Analisamos uma bolota fecal sob microscópio, mas pelo seu tamanho diminuto não foi possível identificar o alimento ingerido.

Jovens exotróficos se locomovem com agilidade entre os grãos de cascalho estendendo os pés ambulacrais na direção do movimento por mais que um comprimento do corpo (Figura 2.35). Durante a locomoção, o espinhos com ponta em forma de coroa posicionados na superfície aboral (Figura 2.32c,d) apóiam-se nos grãos de areia evitando que o cascalho entre em contato direto com a superfície aboral do jovem.

Durante o primeiro mês de vida, os jovens apresentaram um pequeno crescimento em diâmetro e maior especialização do tubo digestório; por transparência visualiza-se três partes: estômago, intestino e reto, além do esôfago (Figura 2.32a). Quatro pedicelárias



Figura 2.35: Jovem de *C. subdepressus* locomovendo-se sob lupa. Seta indica direção do movimento. **A**, anterior; **P**, posterior; **E**, esquerda; **D**, direita.

oficéfalas (Hyman, 1955, pg. 430) surgem na região posterior na altura do âmbito, sendo duas posicionados mais lateralmente (Figura 2.36). Dez dias depois, surge também na região posterior outro tipo de pedicelária, que tem cerca de um quarto do tamanho dos espinhos posteriores, sendo que o esqueleto que a sustenta preenche dois terços de sua extensão e sua cabeça é tridentada. Estas pedicelárias apareceram também na região mediana, mas não na porção anterior do jovem.

A quantidade de jovens metamorfoseados com sucesso foi relativamente baixa. Na cultura cuja fecundação foi realizada no dia 10/01/2007 e mantida a 22 °C, apenas duas larvas metamorfosearam com sucesso, após 35 e 42 d. Nenhuma delas sobreviveu mais do que 30 dpm. A fecundação realizada no dia 05/02/2007 a 26 °C resultou em 12 jovens. O tempo para a metamorfose de 6 deles foi de 19 a 23 dpm após a fecundação.

Os jovens não aceitaram a oferta de diatomáceas bentônicas e náuplios de Artemia como alimento, mas aparentemente alimentaram-se de matéria orgânica presente no cas-



Figura 2.36: Pedicelárias oficéfalas (seta) identificadas 14 d após a metamorfose.

calho. Jovens que estavam em água com alta salinidade moviam-se mais lentamente e os pés ambulacrais tinham pouca atividade, mas se recuperavam ao serem colocados em água com salinidade normal (34).

Os jovens foram mantidos em laboratório até 25/10/2007, completando quase 9 meses de vida, desde a fecundação. Em outubro, os jovens estavam menos ativos e com coloração mais pálida. Seu diâmetro aumentou de ~250 µm para ~500 µm, do dia da metamorfose até sua morte. Os esferídios dos jovens ainda eram visíveis externamente.

2.4 Discussão

As tentativas de induzir a liberação de gametas com injeção de KCl e o estudo da maturação gonadal descrita no Capítulo 3 sugerem que o período reprodutivo de *Clypeaster subdepressus* seja nos meses de verão e começo de outono (novembro a abril). A liberação espontânea de gametas observada em março de 2007 reforça a hipótese de que os indivíduos estejam férteis nesta época do ano e dá indícios de como é o comportamento reprodutivo da espécie.

O episódio sugere que a liberação de gametas ocorra no crepúsculo, e, possivelmente, de forma sincronizada. O comportamento de afastar o cascalho da área onde estão os gonóporos foi também observado em Arachnoides placenta (Aung, 1975, apud Chia, 1977), bolacha-do-mar da mesma família de *C. subdepressus* (Clypeasterina). Este comportamento e o ápex elevado de *C. subdepressus* (\sim 30 mm) podem concorrer para que os gametas dispersem-se na coluna d'água durante a liberação. Contudo, a observação da liberação de gametas no habitat é essencial para compreender o comportamento reprodutivo da espécie. Observações diretas da liberação de gametas de equinodermos na natureza são raras (Strathmann, 1987).

Chia (1977) verificou que as papilas genitais de A. placenta não têm tecido muscular ou nervoso, sugerindo que a pressão hidrostática dos gametas seja responsável pela elevação das mesmas, como parece ocorrer em C. subdepressus. A turgidez das papilas faz com que os gametas sejam liberados acima dos espinhos, o que provavelmente reduz as possibilidades de estresses mecânicos causados pelo movimento dos espinhos e ação das pedicelárias, e evita que os gametas fiquem presos no muco secretado pelo epitélio de clipeasteróides (Chia, 1977).

As papilas genitais de *C. subdepressus* machos e fêmeas são tubulares como em *A. placenta* (Chia, 1977), e a espécie não apresenta dimorfismo sexual externo, como a maioria dos equinóides (Pearse e Cameron, 1991).

Ainda não está claro se a formação de agregados é um comportamento reprodutivo de equinodermos ou se está relacionada à proteção e forrageamento dos indivíduos de uma população (Pearse e Cameron, 1991). Como as populações amostradas de *C. subdepressus* não são constituídas por agregados densos de indivíduos, seria interessante observar se os indivíduos agregam-se durante a liberação de gametas.

Os espermatozóides de C. subdepressus são semelhantes aos dos demais equinóides

(Jamieson, 1985). As descrições detalhadas da fecundação de *Clypeaster japonicus* a 27 °C (Hamaguchi e Hiramoto, 1980) e *Lytechinus variegatus* a 23 °C (Schatten, 1981) identificaram que os filamentos do centrossomo são responsáveis por puxar o pró-núcleo feminino em direção ao pró-núcleo masculino. Este fenômeno faz com que o pró-núcleo feminino inicie seu movimento bruscamente, enquanto o deslocamento do pró-núcleo masculino seja constante em direção ao centro, como observado em *C. subdepressus*. A velocidade de migração dos pró-núcleos de *C. subdepressus* $(0,1 \,\mu\text{m/s})$ foi praticamente a mesma encontrada em *C. japonicus* $(0,082 \,\mu\text{m/s})$ e *L. variegatus* $(0,083 \,\mu\text{m/s})$. A fusão dos pró-núcleos ocorreu mais rapidamente em *C. japonicus* $(13 \min)$ e *L. variegatus* $(15 \min)$, quando comparado a *C. subdepressus* $(18 \min)$.

Imediatamente antes do espessamento da camada hialina (após fusão dos pró-núcleos e antes da primeira clivagem), observamos deformações na superfície do zigoto. Esta proximidade temporal sugere que as deformações podem estar relacionadas à secreção da camada hialina. Contudo, não existe qualquer evidência direta de tal relação e não encontramos descrições semelhantes na literatura revisada (Hamaguchi e Hiramoto, 1980; Schatten, 1981; Pearse e Cameron, 1991; Gilbert, 1997).

As clivagens de *C. subdepressus* seguem o padrão geral dos equinóides com larvas planctotróficas (Strathmann, 1987; Pearse e Cameron, 1991; Wray, 1997). A única diferença notável é que os macrômeros são cerca de 30 % menores que os mesômeros, enquanto em equinóides regulares os macrômeros são maiores. A cinética das clivagens iniciais de *C. subdepressus* é semelhante à espécie *C. rosaceus*; apenas o tempo de eclosão da blástula é diferente, levando cerca de 12 h na última (Emlet, 1986). *Mellita quinquiesperforata* desenvolve-se mais rapidamente; eclode 4 hpf, completa a gastrulação 7 hpf e inicia sua alimentação em 24 h (Caldwell, 1972)². Apesar de o desenvolvimento de *C. subdepressus* ter sido estudado por Emlet (1986), a cinética das clivagens não foi caracterizada em detalhe. Por sua vez, os tempos de desenvolvimento larval descritos por Emlet (1986)

 $^{^2\}mathrm{A}$ temperatura utilizada neste trabalho não foi precisada; os embriões foram fecundados e desenvolveram-se entre 25 e 28 °C.

para C. subdepressus do Caribe à 26 °C foram semelhantes aos encontrados no presente trabalho.

Durante a gastrulação, células com pigmentos vermelhos aparecem no pólo vegetativo e migram através da ectoderme até a região anterior, no tufo apical. Em um estudo comparativo com 6 equinóides regulares e 3 irregulares, Takata e Kominami (2004a) verificaram que o tipo de gastrulação está relacionado com o padrão de migração das células pigmentadas. Equinóides cujas células pigmentadas migram pela ectoderme apresentam a gastrulação do tipo contínua, onde o arquêntero migra pela blastocele com velocidade constante. Este padrão foi encontrado nos equinóides irregulares e em 2 regulares. Nas espécies onde as células pigmentadas posicionam-se na ponta do arquêntero e povoam a ectoderme a partir da região anterior, o tipo de gastrulação é truncada (o arquêntero tem 3 momentos distintos de crescimento, até atingir o teto da blastocele). Em C. subdepressus, as células pigmentadas migram pela ectoderme durante a gastrulação, mas também são encontradas na ponta do arquêntero como descrito em C. japonicus (Takata e Kominami, 2004a). Como as larvas não foram seguidas individualmente nesta fase, não foi possível determinar se a gastrulação de C. subdepressus é contínua ou truncada.

As células com grânulos vermelhos podem ter um importante papel regulador durante a gastrulação, e já foram identificadas como responsáveis por ativar o processo de gastrulação em *Echinometra mathaei* (Takata e Kominami, 2004b). Estas células também podem estar envolvidas na transição entre a fase de prisma e plúteos de *C. subdepressus*, já que estavam ausentes apenas na ectoderme ventral, que permanece relativamente plana até a formação da boca e diferenciação da larva.

Durante a gastrulação da bolacha-do-mar *Scaphechinus mirabilis*, as CMS não se projetam no eixo de alongamento do arquêntero e permanecem agregadas umas às outras (Kominami e Takata, 2000). Em comparação, as CMS de *C. subdepressus* apresentam inúmeras projeções e filopódios ao longo da extensão do arquêntero. Contudo, não é possível precisar se as CMS exercem força para puxar o arquêntero em direção ao teto da blastocele como em *Lytechinus pictus* (Hardin, 1988). A força motriz da invaginação do arquêntero em *S. mirabilis* vem da ectoderme, especialmente do pólo vegetativo (Takata e Kominami, 2001).

A caracterização dos processos de gastrulação pode ser um ponto chave nas discussões sobre a evolução da lecitotrofia em equinodermos. Yajima (2007) observou que ocorrem duas ingressões de células mesenquimais antes da invaginação do arquêntero na bolachado-mar Peronella japonica. As primeiras células aparecem no pólo vegetativo antes da eclosão da blástula e seriam homólogas às CMP. O segundo grupo de células mesenquimais a ingressar na blastocele aparece também no pólo vegetativo, mas ingressam após a eclosão da blástula e antes do início da invaginação do arquêntero. As últimas seriam equivalentes às CMS. Yajima (2007) verificou que as primeiras são exclusivamente derivadas dos micrômeros, sendo responsáveis por formar o esqueleto larval e desaparecendo após a metamorfose. No segundo grupo, estão presentes células responsáveis pela formação do esqueleto do adulto. Embriões que tiveram os micrômeros retirados desenvolveram-se em uma larva plúteos sem braços que por sua vez originaram um jovem com morfologia normal após a metamorfose. Este experimento sugere que os micrômeros e células mesenquimais têm um papel nos movimentos da gastrulação e pode explicar a redução de estruturas larvais comumente observada em larvas lecitotróficas de equinóides (Strathmann, 1978). No caso, o estudo da relação entre a gastrulação e características larvais de diferentes espécies lecitotróficas torna-se essencial para verificar a abrangência do fenômeno observado por Yajima (2007).

Os óvulos de *C. subdepressus* são relativamente pequenos ($\sim 160 \,\mu\text{m}$) e seu desenvolvimento larval é tipicamente planctotrófico, como descrito anteriormente por Emlet (1986). Os óvulos contêm energia suficiente para a formação de todas as estruturas da larva plúteos, como observamos nas larvas mantidas em jejum. No entanto, em larvas mantidas sem alimento o desenvolvimento dos tecidos do rudimento estagnaram no início da invaginação do vestíbulo, mostrando que a formação do rudimento é dependente da

alimentação larval.

Miner et al. (2005) estimaram o tempo que larvas de 5 clipeasteróides alimentadas e em jejum levam para diferir no tamanho, baseado na morfometria do esqueleto larval. Denominado de período de alimentação facultativa, a estimativa foi criada para identificar quando as larvas em jejum têm seu crescimento estagnado devido à depleção de recursos energéticos. Para C. subdepressus os autores verificaram que ocorre diferença no tamanho de larvas alimentadas e em jejum entre 60 e 72 h. Este é, precisamente, o tempo necessário para que o tubo digestório e bandas ciliadas se diferenciem, e as larvas iniciem sua alimentação, nos espécimes de São Sebastião. Como Miner et al. (2005) não identificaram o início da alimentação de cada espécie estudada, é possível que suas estimativas não representem quando as larvas em jejum diminuíram o ritmo de crescimento, mas quando as larvas alimentadas iniciaram sua alimentação e começaram a crescer. Este, provavelmente, é o caso das espécies com larvas planctotróficas obrigatórias, como C. subdepressus. Além disso, a ausência de diferença entre larvas alimentadas e em jejum de C. rosaceus (desenvolvimento planctotrófico facultativo) pode ser decorrente da sua baixa taxa de assimilação de alimento (Reitzel e Miner, 2007), e não devido às reservas energéticas presentes nas larvas em jejum.

Larvas competentes de C. subdepressus exibiram o comportamento de teste de substrato como descrito anteriormente (e.g., Caldwell, 1972; Burke, 1980; Gosselin e Jangoux, 1998; Nunes e Jangoux, 2007). Também ficou evidente que os pés ambulacrais que estendem-se pelo vestíbulo, além de serem o principal meio de adesão da larva e jovem ao substrato, ainda devem exercer importante papel sensorial (Burke, 1980). Mesmo tendo sucesso na indução da metamorfose de C. subdepressus utilizando o substrato do adulto, ainda não está claro se a substância indutora é específica do habitat dos adultos ou se as larvas exibem uma resposta a partir de um estímulo genérico³. Por fim, um teste sistemático precisa ser feito para verificar se as larvas de C. subdepressus apenas

 $^{^3\}mathrm{Algumas}$ larvas se metamorfos
earam após a adição de microalgas na cultura

respondem aos estímulos indutores da metamorfose no período da manhã.

A cultura dos jovens foi bastante empírica, uma vez que pouco se sabe a respeito da alimentação e condições adequadas para o desenvolvimento de clipeasteróides. Logo após a metamorfose os jovens de C. subdepressus têm 3 espinhos por interambúlacro (15 no total), 3 pés e um esferídio por ambúlacro (15 pés e 5 esferídios no total) e nenhuma pedicelária. Por sua vez, larvas competentes dos ouriços-do-mar regulares *Paracentrotus lividus* e Strongylocentrotus franciscanus já carregam pedicelárias (Gosselin e Jangoux, 1998; Miller e Emlet, 1999), enquanto as pedicelárias de *S. purpuratus* aparecem após a metamorfose. Diferentemente de *C. subdepressus*, jovens recém-metamorfoseados de *S. franciscanus*, *S. purpuratus* e *P. lividus* apresentam 4 espinhos principais por interambúlacro (20 no total) (Gosselin e Jangoux, 1998; Miller e Emlet, 1999). O equinóide irregular *Echinocardium cordatum* da ordem Spatangoida tem 3 espinhos primários por ambúlacro após a metamorfose, como *C. subdepressus*, mas também apresenta 1 secundário por ambúlacro e um par de placas diferenciadas com 4 espinhos primários e 2 secundários adicionais em uma das zonas ambulacrais (Nunes e Jangoux, 2007).

O número de pés ambulacrais nos jovens recém-metamorfoseados de C. subdepressus foi maior comparado com o de outros equinóides. S. franciscanus e S. purpuratus (Miller e Emlet, 1999), P. lividus (Gosselin e Jangoux, 1998) e E. cordatum (Nunes e Jangoux, 2007) têm apenas 1 pé por ambúlacro após a metamorfose. Os pés dos equinóides regulares acima não são definitivos e regridem ao longo do desenvolvimento do jovem, enquanto os apêndices de E. cordatum são permanentes, assim como os de C. subdepressus. Um resumo dos apêndices pós-metamórficos de equinóides pode ser encontrado na Tabela 1 de Nunes e Jangoux (2007)

O tempo de desenvolvimento do jovem pós-metamórfico de C. subdepressus até o início de sua alimentação foi consideravelmente mais longo comparado a E. cordatum (Nunes e Jangoux, 2007). No clipeasteróide, o sistema digestório se diferenciou e o jovem tornou-se exotrófico após 7 d, sendo que o ânus abriu após 2 d e a boca somente 7 d após

a metamorfose. A membrana peristomial é extremamente ativa e flexível e deve ter um papel sensorial importante na alimentação. Já em *E. cordatum* a boca abriu primeiro (2 d) e o ânus em seguida, após 3,5 d, quando o jovem tornou-se exotrófico. Assim como *C. subdepressus, E. cordatum* não desenvolve espinhos ou pedicelárias na superfície da larva e o jovem apresenta simetria bilateral (Nunes e Jangoux, 2007).

O tempo de desenvolvimento pós-metamórfico de C. subdepressus (7 d) é semelhante ao ouriço-do-mar P. lividus a 19°C, que torna-se exotrófico em 8 d (Gosselin e Jangoux, 1998). Em P. lividus é a abertura da boca, do ânus e a regressão dos pés primários que marcam a entrada na fase exotrófica, e em C. subdepressus apenas a abertura da boca marca a transição, uma vez que as outras estruturas diferenciam-se primeiro. Outros equinóides exibem um tempo relativamente maior, como S. franciscanus e S. purpuratus cultivados a 14°C, cuja abertura da boca ocorreu após 10 d e 9 d da metamorfose (Miller e Emlet, 1999), respectivamente. Consideramos esta variação pequena frente às diferenças filogenéticas e de temperatura entre C. subdepressus e estes equinóides regulares. Seria interessante avaliar se o tempo de diferenciação tem alguma influência sobre a sobrevivência de jovens pós-metamórficos. Contudo, inúmeros fatores podem influenciar a mortalidade pós-metamórfica de equinodermos, como a predação, patógenos e falta de alimento (Balch e Scheibling, 2001). Além disso, os efeitos latentes herdados da vida larval (Pechenik, 2006), como a relação positiva entre a quantidade de alimento oferecido às larvas e o tamanho dos respectivos jovens após a metamorfose (Miller e Emlet, 1999), também podem ter influência na sobrevivência do jovem.

A atividade intensa dos pés e espinhos do jovem recém-metamorfoseado em contraste com seu deslocamento restrito também foi observada em *P. lividus* (Gosselin e Jangoux, 1998). Se transferidos para uma cultura com substrato, os jovens tendem a se colocar entre os grãos de areia.

Adultos das ordens Cassiduloida e Oligopygoida, que abrigaram as linhagens ancestrais de Clypeasteroida, têm múltiplos esferídios abertos (não envoltos pelo esqueleto) (Mooi, 1990). Os adultos da família Clypeasterina, grupo basal de Clypeasteroida, têm 2 esferídios fechados, e os grupos mais derivados (Laganina e Scutellina) apenas 1 esferídio fechado por ambúlacro. Todos os equinóides irregulares têm um esferídio aberto por ambúlacro após a metamorfose (Mooi, 1990)⁴. A evolução deste caráter pode ser vista de duas formas.

- 1. Múltiplos esferídios \longrightarrow Um esferídio
 - Um esferídio seria plesiomórfico para Clypeasteroida
 - Dois esferídios seria uma autapomorfia de Clypeasterina
- 2. Múltiplos esferídios \longrightarrow Dois esferídios \longrightarrow Um esferídio
 - Dois esferídios seria plesiomórfico para Clypeasteroida

Segundo Mooi (1990), não existem critérios baseados em grupos externos que permitam polarizar o estado do caráter de múltiplos esferídios, para dois esferídios, e para um esferídio [1], apesar de fazer sentido biologicamente. Uma alternativa seria considerar o esferídio único (Laganina e Scutellina) como plesiomórfico para Clypeasteroida [2], tendo como grupo externo o fóssil *Togocyamus*, que apresenta um único esferídio aberto (Mooi, 1990). No entanto, *Togocyamus* apresenta muitas características pedomórficas especializadas, o que desfavorece sua escolha como grupo externo. A presença de um único esferídio por ambúlacro nos jovens de *C. subdepressus* não esclarece esta questão taxonômica, mas sugere a retenção do estado juvenil deste caráter durante a evolução de Laganina e Scutellina.

O fato de os esferídios de *C. subdepressus* permanecerem abertos por 9 meses indica que o fechamento não ocorre logo após a metamorfose como suposto por Mooi (1990). Seria interessante verificar se o fechamento ocorre antes ou depois do aparecimento do segundo esferídio em Clypeasterina.

 $^{^{4}}$ Os regulares, por sua vez, apresentam esferídios calcificados apenas após 9 d em *S. franciscanus* (Miller e Emlet, 1999) e 6 d em *P. lividus* (Gosselin e Jangoux, 1998).

Embora a visualização de detalhes anatômicos da lanterna de Aristóteles de C. subdepressus seja dificultada pelo tecido vivo, que é opaco e com diversas células pigmentadas, o exame de espécimes vivos em microscopia de luz polarizada permite acompanhar a formação dos elementos esqueléticos individualmente e observar mudanças em sua estrutura e movimentação. De maneira geral, a organização da lanterna de C. subdepressus assemelha-se à descrição do clipeasteróide *Echinarachnius parma* (Gordon, 1929). Os elementos esqueléticos da lanterna de C. subdepressus exibem o padrão de equinodermos (estereoma), e possivelmente originam-se a partir de espículas tridentadas (Devanesen, 1922; Gordon, 1926, 1929), exceto pelo dente. O início da formação da lanterna de C. rosaceus foi identificado entre 24 e 48 h após a metamorfose; a lanterna estava formada, mas não funcional em 7 d e o desenvolvimento se completou em torno de 12 d, quando a boca se abriu (Emlet, 1986). A formação foi relativamente mais curta em C. subdepressus, onde logo após a metamorfose foram identificados rudimentos dos dentes, hemipirâmides, epífises e rótulas⁵.

O assentamento de larvas competentes no mesmo substrato dos adultos, observado em laboratório, pode ser um indício de que jovens e adultos convivam no mesmo habitat. O encontro de dois exemplares de tamanho relativamente pequeno, são também evidências nesse sentido. Contudo, nos locais onde os adultos de *C. subdepressus* ocorrem no Canal de São Sebastião, indivíduos menores do que 8 cm de largura são encontrados raramente, não tendo sido observados indivíduos recém-metamorfoseados. O hábito críptico e a alta mortalidade dos jovens (Cameron e Rumrill, 1982) são fatores que devem contribuir para a baixa densidade de jovens recém-metamorfoseados nos locais de estudo.

Jovens pós-metamórficos de M. quinquiesperforata cresceram de 0,35 mm para 3,80 mm do primeiro ao segundo mês, chegando a 6,20 mm no sexto mês de vida após a metamorfose (Caldwell, 1972). Embora jovens exotróficos de C. subdepressus apresentassem conteúdo no tubo digestório e liberassem bolotas fecais, ao longo de 9 meses aumentaram

 $^{^5\}mathrm{Em}$ alguns indivíduos não visualizamos as rótulas, possivelmente devido ao tamanho diminuto das mesmas.

pouco de tamanho (250 a 500 µm). Emlet (1986) verificou que o diâmetro de jovens pósmetamórficos de *C. subdepressus* e *C. rosaceus* aumentou por ~8 d e depois permaneceu constante, em torno de 420 µm. No estudo, os jovens permaneceram em culturas onde ficaram progressivamente mais transparentes e com movimentos mais lentos até morrer após cerca de 30 d. Apesar dos jovens de *C. subdepressus* no presente trabalho terem vivido consideravelmente mais, as condições de sua morte foram semelhantes ao descrito por Emlet (1986). Este crescimento modesto pode ser característico da espécie, como ocorre em *E. parma* que cresceu 1 mm em 4 meses, ou decorrente das condições de cultura no laboratório, que afetaram o desenvolvimento dos jovens. Como o crescimento de equinodermos é bastante plástico (ver abaixo), é possível que a insuficiência nutricional explique o crescimento limitado e a morte precoce dos jovens de *C. subdepressus*. A comparação entre condições de cultivo de clipeasteróides com desenvolvimento rápido (e.g., *D. excentricus*) pode ajudar a determinar em que se baseia a alimentação deste equinóide.

O crescimento de equinóides fica registrado na forma de bandas periódicas (linhas de crescimento) em placas, espinhos e ossículos do esqueleto. Apesar de o período de deposição ser comumente assumido como anual, a utilização das linhas de crescimento para estimar a idade é controversa, já que a nutrição, temperatura e regime de ondas podem influenciar o crescimento de um indivíduo (Durham, 1955). Pearse e Pearse (1975) mostraram que a privação de alimento diminui a taxa de crescimento de *S. purpuratus*, e conseqüentemente o ritmo de formação das bandas, levantando evidências de que estas linhas são imprecisas para estimar a idade dos equinodermos. Do mesmo modo, Russell e Meredith (2000) verificaram que, em espécimes de *S. droebachiensis* marcados com um corante fluorescente e analisados por um ano, as linhas de crescimento subestimaram o tempo transcorrido, mostrando que as linhas de crescimento não indicam a idade com precisão.

A estimativa de idade através da contagem de linhas de crescimento precisa ser feita

com cautela e requer que algumas condições sejam satisfeitas. Como os equinóides podem ter placas com idades diferentes, e como as placas mais velhas nem sempre são as maiores (Raup, 1968), seria necessário verificar que a placa analisada tenha se formado logo após a metamorfose (Russell e Meredith, 2000). Neste caso, seria essencial conhecer o ritmo de deposição das linhas de crescimento utilizando animais de idade conhecida, já que placas mais velhas podem ter uma taxa de crescimento diminuída (como observado em Birkeland e Chia, 1971; Kang et al., 2007). Por fim, o número de linhas precisa ser independente do tamanho do indivíduo (Pearse e Pearse, 1975).

Em *D. excentricus*, cujo número de placas não muda ao longo da ontogenia, as diferentes placas interambulacrais de um indivíduo apresentam o mesmo número de linhas de crescimento, e este número tem boa correlação com o tamanho do indivíduo (Birkeland e Chia, 1971). Nesse estudo, verificou-se que o crescimento inicial é bastante acentuado, mas nos últimos 3 anos de vida as bolachas ficam praticamente com o mesmo tamanho. A estimativa de vida de *D. excentricus* foi de 9 anos (Birkeland e Chia, 1971). Zoeke (1952) (apud Durham, 1955) sugeriu que as linhas de crescimento de *Clypeaster* representam ciclos sexuais. Baseado em uma figura do trabalho de Zoeke (1952) e assumindo que o ciclo reprodutivo de *Clypeaster* seja anual (como descrito no Capítulo 3 para *C. subdepressus*), Durham (1955) estimou que um exemplar de 18 cm teria 25 anos. Não analisamos as linhas de crescimento de *C. subdepressus* adultos coletados neste trabalho, mas o desenvolvimento dos jovens pós-metamórficos sugere que a espécie tenha um crescimento lento com estimativa de vida superior a 30 anos.

Capítulo 3

Ciclo reprodutivo

3.1 Introdução

De modo geral, populações de equinóides de águas rasas apresentam ciclo reprodutivo anual com períodos discretos de gametogênese e liberação de gametas (Pearse e Cameron, 1991). Os clipeasteróides não são exceção e o ciclo anual de maturação gonadal já foi descrito para *Echinodiscus bisperforatus* (Bentley, 1998), *Mellita quinquiesperforata* (Lane e Lawrence, 1979; Tavares e Borzone, 2006) e *Dendraster excentricus* (Cameron e Rumrill, 1982; Strathmann, 1987). Indivíduos de uma mesma população comumente apresentam ritmos próprios, de modo que numa amostragem pode-se encontrar todos os estágios gonadais. O fator mais influente que sincroniza a maturação gonadal entre indivíduos é o fotoperíodo (Gonor, 1973; Byrne, 1990; Byrne et al., 1998; Harrington et al., 2007).

Diversos métodos são empregados para o estudo do ciclo reprodutivo de equinóides. Entre eles pode-se destacar a indução de liberação de gametas, a quantificação do tamanho dos óvulos, peso gonadal e finalmente a histologia. Geralmente, mais de um método é utilizado num mesmo estudo, o que ajuda a compreender melhor o fenômeno.

Lessios (1987) observou que o diâmetro dos óvulos de C. subdepressus do Caribe é

menor depois de setembro, mas este padrão não se repetiu no ano seguinte, havendo diferença entre as médias de outubro de 1982 e 1985. O mesmo autor obteve gametas ao longo de todo ano (1982 e 1983) utilizando injeção de KCl (Lessios, 1985). Estes estudos sugerem que esta população de C. subdepressus do Caribe não apresenta um ciclo anual bem definido, uma vez que boa parte da população está madura ao longo do ano inteiro. No entanto, Lessios (1985) utilizou um método indireto para avaliar a maturidade de seus exemplares (liberação dos gametas e diâmetro dos óvulos), não existindo dados histológicos sobre a maturação gonadal de C. subdepressus.

Neste trabalho caracterizamos de forma qualitativa os estágios gonadais da bolachado-mar *C. subdepressus* utilizando cortes histológicos das gônadas. Através de uma análise morfométrica complementar quantificamos as diferenças do epitélio germinativo entre os estágios gonadais descritos. Além disso, coletas mensais ao longo de um ano permitiram inferir o ciclo reprodutivo da espécie, utilizando as ocorrências relativas mensais de cada estágio gonadal.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Coleta dos adultos

A metodologia para coleta de indivíduos adultos foi a mesma descrita na seção 2.2.1. Entre dezembro de 2006 e novembro de 2007 coletamos 10 indivíduos adultos por mês (exceto junho de 2007, quando coletamos 9) sempre em períodos de Lua nova $(\pm 3 d)$, a fim de padronizar um possível ritmo reprodutivo arrastado pelo ciclo lunar. Fotografamos, medimos e pesamos os indivíduos logo após a coleta e antes da fixação (Figura 2.2). Medimos a altura do eixo oral/aboral, a espessura da borda no ambúlacro III e o peso úmido dos exemplares (precisão de 0,1 g). Os indivíduos coletados em junho e agosto de 2007 foram mensurados após a fixação.

3.2.2 Dissecção

Após os procedimentos iniciais (subseção 3.2.1) fixamos as bolachas-do-mar recém coletadas como descrito a seguir. Utilizando uma seringa, injetamos cerca de 5 mL de solução de formol 4 % na cavidade celomática, a fim de fixar as gônadas adequadamente, e em seguida os indivíduos foram imediatamente submersos na mesma solução fixadora¹. Os lotes mensais foram mantidos em baldes de 30 L até o processo de dissecção.

Uma semana antes da extração das gônadas adicionamos em cada balde o volume de ácido acético correspondente à 5% do volume final da solução fixadora utilizada. Esta proporção é a mesma presente no fixador Bouin e descalcificou o esqueleto das bolachas-do-mar. Uma semana foi suficiente para amolecer o esqueleto, descalcificando-o adequadamente e facilitando a dissecção. A identificação dos indivíduos foi feita através das fotografias tiradas no dia da coleta, o que permitiu relacionar dados morfométricos e maturação gonadal.

Como as gônadas de *C. subdepressus* localizam-se nas áreas interambulacrais dentro da cavidade celomática (Figura 3.1), o esqueleto foi partido nas suturas perradiais das áreas ambulacrais II e III separando a área interambulacral 2 do resto do corpo (ver Figura 2.2). Dissecamos apenas a gônada interambulacral 2 de cada indivíduo, como descrito a seguir.

Primeiramente cortamos com uma pinça a junção dos pilares ósseos e dos mesentérios com o teto da cavidade celomática (Figura 3.2). Deste modo, o esqueleto aboral pôde ser separado da gônada minimizando os danos aos tecidos. Utilizamos o mesmo procedimento para separar as placas orais da gônada. A parede que separa a gônada do intestino requer cuidado especial, pois é extremamente resistente e precisa ser quebrada na base, por completo, antes de a gônada ser excisada.

¹Testamos outro método menos invasivo para a extração do tecido gonadal abrindo um orifício na superfície aboral. No entanto, este método mostrou-se pouco eficaz já que a pequena quantidade de tecido era danificada com facilidade durante o processo de extração, podendo interferir nas análises histológicas posteriores. Assim, optamos pela fixação do indivíduo inteiro.



Figura 3.1: Representação de um exemplar adulto de *C. subdepressus* em vista aboral mostrando a posição das gônadas em relação a outras estruturas.

Após a extração imergimos as gônadas em solução de ácido acético 5% em água destilada, para a descalcificação dos pilares ósseos remanescentes. Um dia depois lavamos as gônadas em água doce corrente e desidratamos em série alcoólica crescente até a concentração de 70%. Cerca de 3d após a desidratação medimos o peso úmido das gônadas em balança de precisão. Retiramos o excesso de álcool das gônadas mantendo-as em posição vertical por 3 minutos. Após a pesagem devolvemos as gônadas aos respectivos frascos com álcool 70%, onde foram mantidas até o início do processamento para histologia (ver 3.2.4).



Figura 3.2: Gônada de *C. subdepressus* (a) Visão aboral de uma gônada dissecada mostrando o grande número de pilares ósseos (asteriscos) presentes entre o tecido. (b) Posicionamento da gônada na cavidade celomática. Sustentação por ligamentos fixados no teto da cavidade (seta) e presença de pilares de esqueleto dentro da cavidade e no meio do tecido gonadal. (c) Detalhe do tecido gonadal.

3.2.3 Indice gonadal

Calculamos o índice gonadal através da equação (adaptado de MacCord e Ventura, 2004), baseado no peso úmido de apenas uma gônada de cada indivíduo:

 $IG = \frac{\text{peso úmido da gônada}}{\text{peso úmido do exemplar - (peso úmido da gônada)}}$

3.2.4 Histologia

Separamos aleatoriamente 5 gônadas de cada mês para as análises histológicas. Excisamos uma pequena porção da região anterior da gônada, adjacente ao gonoduto (ver Figura 3.4b) e desidratamos a amostra em série alcoólica (70 a 100%). Em seguida, a amostra foi imersa em uma mistura 1:1 de etanol 100% e resina plástica (Historesin - Leica) por 2 h, em temperatura ambiente, e embebida na resina ativada pura por 4 h para que a infiltração se completasse. Posicionamos as amostras em formas de plástico e preenchemos com uma solução de resina e endurecedor. As formas ficaram em estufa seca (37°C) e a vácuo, para evitar interferências causadas pela umidade no processo de polimerização da resina. Cerca de um ou dois dias na estufa foram suficientes para endurecer a resina por completo. Retiramos o material das formas, colamos em blocos de madeira e cortamos em micrótomo com navalha de vidro, numa espessura de 2 µm. Os cortes foram estirados em água de torneira e montados em lâmina de vidro. Após a secagem utilizamos as colorações de azul de toluidina a 1% por 1 min, corante geral para identificação dos estágios; picrosirius (0.1% por 1h) para identificação de estruturas colágenas; e a reação histoquímica de Ácido Periódico-Schiff (PAS) para identificação de estruturas com reserva de energia (glicogênio).

3.2.5 Análise

Utilizamos as características citológicas e histológicas para identificar o estágio gonadal de cada lâmina. Para tal analisamos de forma qualitativa a presença de vilosidades, tipos de inclusões presentes nos fagócitos nutritivos, presença de vitelo, presença e distribuição das espermatogônias e oogônias, presença e características dos oócitos e a presença de gametas no lúmen dos túbulos gonadais. Após a identificação das gônadas calculamos as freqüências relativas mensais de cada estágio gonadal.

Fotografamos as lâminas cujos túbulos haviam sido cortados transversalmente para uma análise morfométrica. Por meio do programa de processamento de imagens *ImageJ* (Rasband, 2008) calculamos a área, diâmetro, perímetro dos túbulos e área ocupada pelo epitélio germinativo (fagócitos nutritivos e células germinativas). Não incluímos óvulos e espermatozóides na última medição, apenas oócitos que ainda estavam envolvidos pelos fagócitos nutritivos (Figura 3.3). Comparamos as médias destas medidas para cada estágio gonadal. Calculamos a porcentagem de ocupação do lúmen pelo epitélio germinativo por meio da equação:

$$AEG = \frac{\text{área do epitélio germinativo}}{\text{área total do túbulo}} \times 100$$

Utilizamos o teste t par-a-par para comparar médias com distribuição normal e variâncias homogêneas, e a aproximação de graus de liberdade de Welch para lidar com a heterogeneidade das variâncias (Zar, 1996, pg. 129). Comparamos conjuntos de dados sem distribuição normal e com variâncias heterogêneas com o teste de Wilcoxon par-apar. Verificamos as correlações paramétricas com o coeficiente de correlação de Pearson e as não-paramétricas com o coeficiente de correlação de Spearman. Testamos a normalidade dos dados com o teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias com o teste de Bartlett. Para comparar as variâncias de dois conjuntos de dados utilizamos o teste F. Os testes foram considerados estatisticamente significativos quando P < 0,050.

Utilizamos a linguagem R (R Development Core Team, 2005) para o manejo dos dados morfométricos e execução de análises estatísticas. Em todo o trabalho, os nomes dos testes estão assinalados em fonte monoespaçada e os nomes dos estágios gonadais



Figura 3.3: Corte histológico de uma das gônadas de *C. subdepressus* durante a análise morfométrica com o programa *ImageJ*. A marcação mostra a estimativa da área ocupada pelo epitélio germinativo.

estão assinalados em negrito. Os dados estão expressos na forma média±desvio padrão.

3.3 Resultados

3.3.1 Anatomia

Adultos apresentam cinco gônadas posicionadas nas zonas interambulacrais e interconectadas por projeções do tecido gonadal nas zonas ambulacrais (Figura 3.1). O tecido é constituído de túbulos alongados com ramificações arborescentes e anastomosadas, de coloração cinza escuro ou marrom, que crescem entremeados aos pilares do esqueleto. As gônadas de alguns indivíduos apresentam manchas de uma substância negra viscosa aderida à sua superfície (Figura 3.2b,c), que soltam-se facilmente quando lavadas (recém-dissecadas ou fixadas). Uma série de ligamentos mesentéricos ancorados no teto da cavidade celômica sustenta cada gônada (Figura 3.2b). A porção mais distal da gônada é contida pela parede do espaço celômico por onde passa o trato digestório, mas uma fina camada de tecido gonadal estende-se sob o intestino. Na região mais central, o gonoduto se estende até o gonóporo apical (Figura 3.4).

3.3.2 Índice Gonadal

O histograma do peso úmido dos indivíduos adultos de *C. subdepressus* está representado na Figura 3.5. A média e desvio padrão do peso foi de 368 ± 80 g sendo 34 e 672 g os valores mínimo e máximo, respectivamente (n = 241). A altura do ápex foi de 28 ± 3 mm, com mínimo de 17 mm e máximo de 39 mm (n = 256). A espessura da borda no ambúlacro III foi de 8 ± 1 mm, com mínimo e máximo de 5 e 12 mm (n = 241), respectivamente. Peso, altura e espessura da borda destes indivíduos não apresentaram distribuição normal (P < 0.001).

A média do peso de uma gônada de *C. subdepressus* foi de $2,7 \pm 1,1$ g (n = 119), com amostras entre 0,6 g e 7,7 g, coletados nos estágios de **recuperação** e **prematuro**, respectivamente (Tabela 3.1 e Figura 3.6). Apesar das variâncias serem significativamente diferentes (P = 0,007), os estágios apresentaram distribuição normal. Assim, aplicou-se o teste t par-a-par usando a aproximação de graus de liberdade de Welch (ver 3.2.5). O estágio **prematuro** apresentou diferenças significativas entre os estágios de **recuperação** (P = 0,002) e **proliferação** (P = 0,010) (Tabela 3.2).

Tabela 3.1: Médias do peso gonadal por estágio gonadal. (média \pm desvio padrão)

Recuperação $n = 14$	Proliferação n = 13	$\begin{array}{c} \text{Prematuro} \\ n = 13 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Maduro} \\ n=5 \end{array}$	Pós Liberação $n = 9$	$\begin{array}{c} \text{Depleção} \\ n=6 \end{array}$
$2{,}1\pm0{,}7$	$2{,}3\pm0{,}7$	$3,7\pm1,6$	$3,0\pm1,2$	$2{,}7\pm0{,}7$	$2,6\pm0,8$

Fizemos o estudo da correlação entre o peso das gônadas e o peso corpóreo com 60 indivíduos (n = 5 por mês, 34 machos e 26 fêmeas). Os valores foram trabalhados em log para evidenciar o tipo de relação alométrica entre as variáveis. O teste de normalidade



(a) Aboral



(b) Oral

Figura 3.4: Gônada de *C. subdepressus* após excisão, descalcificação e limpeza. Linha pontilhada marca a área da gônada separada para a histologia. **g**, gonoduto; **m**, mesentério; **tg**, tecido gonadal; **ep**, espaço dos pilares ósseos; **tgi**, tecido gonadal sob intestino.



Figura 3.5: Histograma mostrando a distribuição do peso úmido de indivíduos machos e fêmeas da bolacha-do-mar C. subdepressus.



Figura 3.6: Médias do peso gonadal de C. subdepressus por estágios gonadais.

	Recuperação	Proliferação	Prematuro	Maduro	Pós Liberação
Proliferação	1,000	-	-	-	-
Prematuro	0,002	0,010	-	-	-
Maduro	1,000	1,000	1,000	-	-
Pós Liberação	1,000	1,000	$0,\!295$	$1,\!000$	-
Depleção	1,000	1,000	0,332	$1,\!000$	1,000

Tabela 3.2: Valores de P obtidos na comparação dos pesos gonadais de cada estágio. O teste realizado foi o teste t par-a-par com a aproximação de Welch entre os diferentes estágios gonadais. Valores em negrito foram considerados significativos, $\alpha = 0.05$.

mostrou que a distribuição dos pesos gonadal e corpóreo não é normal (P = 0,042 e 0,017) e o teste F indicou que as variâncias não são homogêneas (P < 0,001). Através do teste de correlação de **Spearman** rejeitamos a hipótese de correlação entre o peso corpóreo e peso gonadal com P = 0,097 (Figura 3.7). Como não houve correlação entre o peso gonadal e o peso corpóreo do indivíduo, o índice gonadal não foi utilizado como parâmetro normalizador nas comparações entre os diferentes estágios.

Calculamos o índice gonadal (3.1) para estimar a proporção do peso corpóreo referente ao peso das gônadas nos indivíduos. A média de todos os indivíduos amostrados foi de $0,4 \pm 0,3\%$, sendo que o menor valor chegou a 0,2% e o maior 2,6\%. Considerando que os clipeasteróides possuem cinco gônadas, e assumindo que elas têm pesos semelhantes, estimamos que as gônadas contribuam de 1,0 a 15,0\% no peso de um espécime adulto de *C. subdepressus*.

3.3.3 Histologia

Os túbulos que constituem o tecido gonadal estão imersos no líquido do celoma perivisceral. A camada epitelial mais externa do túbulo é o peritônio, monocamada de células ciliadas voltada para o celoma perivisceral e apoiada numa lâmina basal. Adjacente ao peritônio existe uma cápsula de colágeno com células granulosas infiltradas e espessura aproximada entre $8 \,\mu\text{m} = 70 \,\mu\text{m}$ (média = $30 \,\mu\text{m}$). Entre a cápsula de colágeno e



Figura 3.7: Correlação não significativa entre o peso gonadal e corpóreo C. subdepressus.

a próxima camada epitelial, o epitélio muscular, existe um espaço de tamanho variável denominado seio genital. O epitélio formado por músculo liso encontra-se entre o seio genital e o espaço hemal, e as fibras musculares são perpendiculares ao maior eixo dos túbulos.

O espaço hemal separa o epitélio muscular do epitélio germinativo abrigando as lâminas basais destes epitélios. Nos cortes, o espaço hemal apresenta-se bastante reduzido, restrito aos canais formados pelas vilosidades do epitélio germinativo. Celomócitos são encontrados infiltrados no seio genital e no espaço hemal em diversas gônadas (Figura 3.9b). O epitélio germinativo é formado por fagócitos nutritivos e células germinativas, crescendo sobre a lâmina basal junto ao espaço hemal. O epitélio germinativo está voltado ao lúmen da gônada, onde os gametas são acumulados.

Em todos os estágios gonadais, exceto no **maduro** (ver abaixo), há diversas extensões da lâmina basal do epitélio germinativo em direção ao lúmen. Estas extensões formam



Figura 3.8: Ilustração mostrando a organização tecidual da gônada de *C. subdepressus*. Os espaços presentes na gônada estão nomeados à esquerda em cinza e os epitélios à direita, em preto. A gametogênese de machos (a) e fêmeas (b) foi representada com células germinativas em diferentes estágios de maturação.

vilosidades que aumentam a superfície do epitélio e criam compartimentos no lúmen. Nas fêmeas, a distribuição das oogônias e oócitos parece ser independente das vilosidades (Figura 3.11), mas nos machos as espermatogônias e espermatócitos parecem se concentrar na base das vilosidades (Figura 3.21).

Os fagócitos nutritivos apresentam uma série de inclusões como grânulos, fagossomos, vacúolos, glóbulos hialinos e glóbulos escuros. Glóbulos hialinos são transparentes e circulares, com contorno definido e diâmetro de $\sim 15 \,\mu\text{m}$, podendo ocupar metade do citoplasma de um fagócito nutritivo. Glóbulos escuros são semelhantes aos glóbulos hialinos, mas são basófilos, com ornamentos e diâmetro de $\sim 10 \,\mu\text{m}$. Encontramos estas estruturas em diferentes estágios gonadais. O padrão das estruturas citoplasmáticas dos fagócitos nutritivos numa mesma gônada é homogêneo.

A caracterização dos estágios gonadais foi baseada em estudos anteriores realizados com equinodermos (e.g., Lane e Lawrence, 1979; Byrne, 1990; Pearse e Cameron, 1991; MacCord e Ventura, 2004; Walker et al., 2005; Tavares e Borzone, 2006).

Fêmeas

Identificamos 6 estágios de maturação gonadal nas fêmeas de C. subdepressus.

- **Recuperação** (n = 7): Epitélio germinativo com vilosidades, ocupando $80,4 \pm 9,4 \%$ da área gonadal. Grânulos dos fagócitos nutritivos relativamente densos e presentes na maior parte do citoplasma, com poucos glóbulos hialinos e vacúolos. Pequenos oócitos pré-vitelogênicos presentes na lâmina basal; lúmen não contém óvulos. O diâmetro médio do túbulo em corte transversal é de $0,68 \pm 0,21$ mm (Figura 3.9).
- Proliferação (n = 1): Fagócitos nutritivos contêm grande quantidade de grânulos densos, poucos glóbulos hialinos e vacúolos. Muitos oócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos e vitelogênicos crescendo entre os fagócitos nutritivos; lâmina basal com muitas vilosidades.
 O único túbulo em corte transversal tinha diâmetro reduzido (0,36 mm). A ocu-



Figura 3.9: Corte histológico de uma gônada de *C. subdepressus* fêmea na fase de **recuperação**. (a) Fagócitos nutritivos organizados em vilosidades; quantidade mediana de grânulos. Oócitos primários pré-vitelogênicos presentes na lâmina basal; lúmen está vazio. (b) Detalhe das vilosidades. **sg**, seio genital; **ln**, lúmen; **v**, vilosidade; **oppv**, oócito primário pré-vitelogênico; **fn**, fagócito nutritivo; **vc**, vacúolo; **cl**, celomócitos; **em**, epitélio muscular; **eh**, espaço hemal.



Figura 3.10: Corte histológico de uma gônada de *C. subdepressus* fêmea na fase de **proliferação**. Fagócitos nutritivos com grande quantidade de grânulos densos. Oócitos primários vitelogênicos presentes na lâmina basal; lúmen está vazio. **sg**, seio genital; **ln**, lúmen; **opv**, oócito primário vitelogênico; **fn**, fagócito nutritivo; **ce**, celoma.



Figura 3.11: Corte histológico de uma gônada de *C. subdepressus* fêmea no estágio **prematuro**. Epitélio germinativo com diversas vilosidades; fagócitos nutritivos com grande quantidade de grânulos densos; muitas oogônias, oócitos primários pré-vitelogênicos e vitelogênicos; óvulos maduros presentes no lúmen. **sg**, seio genital; **ln**, lúmen; **ov**, óvulo; **fn**, fagócito nutritivo; **ce**, celoma; **v**, vilosidade.


Figura 3.12: Corte histológico de uma gônada de *C. subdepressus* fêmea no estágio **maduro**, mas com lúmen já vazio, após a liberação dos óvulos. Epitélio germinativo fino e sem vilosidades; ocupa apenas $49.0 \pm 19.1 \%$ da área do túbulo. Fagócitos nutritivos com poucos grânulos no citoplasma e vilosidades reduzidas. Oogônias ausentes; poucos oócitos primários; óvulos presentes no lúmen. **sg**, seio genital; **ln**, lúmen; **ov**, óvulo; **fn**, fagócito nutritivo; **ce**, celoma.



Figura 3.13: Corte histológico de uma gônada de *C. subdepressus* fêmea no estágio de **pós-liberação**. Fagócitos nutritivos com glóbulos hialinos e vacúolos, mas poucos grânulos no citoplasma (detalhe). Em algumas gônadas o epitélio mostra sinais de desorganização. Vilosidades discretas. Alguns oócitos na lâmina basal; oogônias ausentes. Óvulos remanescentes do ciclo anterior no lúmen. **sg**, seio genital; **ln**, lúmen; **ov**, óvulo; **fn**, fagócito nutritivo; **gh**, glóbulo hialino.



Figura 3.14: Corte histológico de uma gônada de *C. subdepressus* fêmea no estágio de **depleção**. Epitélio germinativo com aparência degenerada. Fagócitos nutritivos com poucos vacúolos e glóbulos hialinos. Poucos oócitos na lâmina basal; oócitos residuais presentes; lúmen vazio. **sg**, seio genital; **ln**, lúmen; **ce**, celoma; **or**, oócito residual.

pação do epitélio germinativo no restante da gônada é semelhante aos estágios de **recuperação** e **prematuro**. Não há óvulos no lúmen (Figura 3.10).

- **Prematuro** (n = 7): Epitélio germinativo de alguns indivíduos como no estágio anterior; espesso com diversas vilosidades e grande quantidade de grânulos densos nos fagócitos nutritivos, exceto na porção distal de cada célula que parece vacuolada. Outros indivíduos podem apresentar fagócitos nutritivos com muitos glóbulos hialinos e poucos grânulos. O epitélio ocupa $75,2\pm8,6\%$ do lúmen e nele encontramos muitas oogônias e oócitos primários pré-vitelogênicos e vitelogênicos. O diâmetro médio dos túbulos neste estágio é de $0,85\pm0,23$ mm. Óvulos maduros presentes no lúmen (Figura 3.11).
- Maduro (n = 1): Não foi observada nenhuma gônada com o lúmen repleto de óvulos, mas foram encontrados estágios que sugerem que a liberação dos óvulos acabara de ocorrer. Neste estágio o epitélio germinativo é fino e sem vilosidades, ocupando apenas $49,0 \pm 19,1 \%$ da área do túbulo em corte transversal. Os fagócitos nutritivos, por sua vez, têm pequena quantidade de grânulos no citoplasma. Oogônias não foram observadas e poucos oócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos ocupam o epitélio. Óvulos estão presentes no amplo lúmen e o diâmetro médio dos túbulos é de $0,99 \pm 0,49$ mm (Figura 3.12).
- **Pós-Liberação** (n = 5): Epitélio germinativo ocupando $65,5 \pm 13,6\%$ do túbulo; fagócitos nutritivos com muitos glóbulos hialinos e vacúolos, mas poucos grânulos no citoplasma. Em algumas gônadas o epitélio mostra sinais de desorganização. Vilosidades menores que nos estágios anteriores, exceto no **maduro**; alguns oócitos pré-vitelogênicos encontram-se sobre a lâmina basal. Oogônias não foram observadas. O diâmetro médio dos túbulos foi de $0,67 \pm 0,21$ mm. No lúmen encontram-se poucos óvulos remanescentes do ciclo anterior (Figura 3.13).

Depleção (n = 5): O epitélio germinativo neste estágio tem aparência degenerada ocu-

pando $71,6 \pm 16,5 \%$ da área do lúmen da gônada. Os fagócitos nutritivos contêm poucos vacúolos e glóbulos hialinos; grânulos menos densos do que na fase **prematura**. Alguns oócitos pré-vitelogênicos presentes na lâmina basal; lúmen vazio. O diâmetro médio dos túbulos é de $0,63 \pm 0,34$ mm (Figura 3.14).

PAS O estágio com maior quantidade de grânulos PAS+ no citoplasma dos fagócitos nutritivos foi o de **proliferação**. Esse número diminui drasticamente nos estágios **maduro** e **pós-liberação** e volta a crescer na **recuperação** (Figura 3.15). Grânulos do estágio de **depleção** assemelham-se aos de **recuperação**. O líquido presente no espaço hemal de algumas gônadas é PAS+.

Oogênese

Oogônias: Citoplasma acidófilo, sem grânulos ou vacúolos e com aparência lisa. Diâmetro celular varia entre 4 e 11 µm. Núcleo apresenta grumos de cromatina e nucléolo irregular. A razão $\frac{núcleo}{citoplasma} \times 100 = 51,0 \pm 11,9\%$. Membrana do núcleo bem definida e espessa. Célula aderida à lâmina basal comumente agregada à outras oogônias (Figura 3.16a).

Oócitos primários

Pré-Vitelogênico: Diâmetro celular de 25 a 75 µm. A razão $\frac{núcleo}{citoplasma}$ torna-se menor (22,7 ± 5,4 %), devido ao aumento da área citoplasmática em relação ao núcleo. Núcleo de aparência irregular e membrana mais fina. Nucléolo torna-se redondo e bastante denso. Citoplasma continua liso, sem grânulos ou vacúolos, até certo tamanho. Oócitos maiores apresentam pequenas inclusões PAS+ e pequenos vacúolos. Membrana sem microvilosidades. Lâmina basal coberta por fagócitos nutritivos formando uma câmara de incubação individual; oócitos aderidos à lâmina basal (Figura 3.16b).



Figura 3.15: Cortes histológicos dos diferentes estágios da gônada de *C. subdepressus* fêmea mostrando grânulos PAS+. **ov**, óvulo; **ln**, lúmen; **opv**, oócito primário vitelogênico; **oppv**, oócito primário pré-vitelogênico.

- Vitelogênico: Núcleo com pouca heterocromatina e com membrana fina. Nucléolo continua redondo e denso. Razão <u>núcleo</u> 14,0 ± 1,5 %; diâmetro das células variando de 94 a 129 μm. Citoplasma rugoso com inúmeras inclusões densas e vacúolos. Grânulos PAS+ em todo o citoplasma. Membrana plasmática com microvilosidades. Câmara de incubação bastante evidente e oócitos aderidos à lâmina basal (Figura 3.16c,d).
- **Óvulos:** Núcleo raramente visível, com cromatina descondensada e sem nucléolo. Quebra da vesícula germinativa (núcleo) parece ocorrer com o oócito ainda aderido à lâmina basal. Grânulos PAS+ densamente distribuídos pelo citoplasma exceto na periferia, onde encontram-se os grânulos corticais. A migração dos grânulos corticais à periferia da célula parece ocorrer após a quebra da vesícula germinativa. Citoplasma bastante vacuolado e rugoso e membrana plasmática sem vilosidades. O diâmetro dos óvulos é de $151 \pm 8 \,\mu\text{m}$ (Figura 3.17).

Machos

Identificamos 6 estágios de maturação gonadal nos machos de C. subdepressus.

Recuperação (n = 7): O epitélio germinativo deste estágio apresentou três formações diferentes: pode exibir vilosidades com camada espessa de fagócitos nutritivos, dispostos organizadamente e ocupando $84,8 \pm 7,7\%$ do túbulo, num corte transversal; pode estar desorganizado, ocupando todo o espaço do lúmen; ou pode estar desestruturado. Nos três casos os fagócitos nutritivos apresentam grande quantidade de grânulos, ausência de glóbulos hialinos, glóbulos escuros e vacúolos, resultando numa aparência granulada (Figura 3.18a). Este estágio é caracterizado, sobretudo, pela grande quantidade de fagossomos com diferentes quantidades de espermatozóides (até 30 por fagossomo) (Figura 3.18b,c). As espermatogônias estão ausentes ou são raras. Espermatócitos estão ausentes, exceto em um indivíduo, onde encontra-



(c) Oócito primário vitelogênico inicial

(d) Oócito primário vitelogênico tardio

Figura 3.16: Etapas da oogênese em *C. subdepressus.* (a) Oogônias (**og**) agregadas na lâmina basal. (b) Oócitos primários pré-vitelogênicos (**oppv**) envolvidos pelos fagócitos nutritivos (**fn**). (c) Oócito primário vitelogênico inicial (**opv**) aderido à lâmina basal (**lb**) de uma vilosidade; citoplasma com algumas inclusões. (d) Oócitos primários vitelogênicos no final da maturação dentro da câmara incubadora (**ci**) formada pelos fagócitos nutritivos; citoplasma repleto de vitelo. **sg**, seio genital; **ln**, lúmen; **em**, epitélio muscular.



Figura 3.17: Óvulos de *C. subdepressus* no lúmen da gônada com citoplasma repleto de vitelo. Grânulos corticais distribuídos marginalmente (detalhe). \mathbf{ov} , óvulos; \mathbf{ln} , lúmen; \mathbf{gc} , grânulos corticais.

mos espermatócitos remanescentes. Espermatogênese ausente. Espermatozóides no lúmen são raros e o diâmetro médio dos túbulos é de 0.48 ± 0.25 mm.

Proliferação (n = 12): O diâmetro médio dos túbulos, em corte transversal, é de 0,65± 0,21 mm. Epitélio germinativo com 10-15 vilosidades, ocupando 72,3±12,0% do lúmen (Figura 3.19). Fagócitos nutritivos com muitos grânulos basófilos e densos que ocupam a maior parte do citoplasma (Figura 3.20). Além de grânulos, o citoplasma pode conter glóbulos hialinos, glóbulos escuros, vacúolos e fagossomos contendo espermatozóides. A presença de fagossomos não é dominante neste estágio e sugere a reabsorção de espermatozóides do ciclo anterior. Espermatogônias e espermatócitos são facilmente identificados sobre a lâmina basal. Numerosos espermatócitos formam agregados que predominam nas intervilosidades (Figura 3.21). O dobramento da lâmina basal cria canais longitudinais no espaço hemal, na base das



Figura 3.18: Corte histológico de uma gônada de *C. subdepressus* macho no estágio de **recuperação**. (a) Epitélio germinativo com vilosidades e fagócitos nutritivos (**fn**) com grânulos em quantidade; aparência granulada. Espermatogônias, espermatócitos e espermatozóides raros. (b) Diversos fagossomos de fagócitos nutritivos contendo espermatozóides. (c) Grande fagossomo. **sg**, seio genital; **ln**, lúmen; **ce**, celoma.



Figura 3.19: Corte histológico de uma gônada de *C. subdepressus* macho no estágio de **proliferação**. Epitélio germinativo com vilosidades. Fagócitos nutritivos com grânulos basófilos e densos; glóbulos hialinos (**gh**) presentes. Espermatogônias e espermatócitos na lâmina basal. Quantidade mediana de espermatozóides no lúmen. **sg**, seio genital; **ln**, lúmen; **ce**, celoma; **ez**, espermatozóides; **v**, vilosidade; **fn**, fagócito nutritivo.



Figura 3.20: Detalhe de uma vilosidade na gônada de *C. subdepressus* macho no estágio de **proliferação**. Fagócitos nutritivos (**fn**) com grânulos basófilos e densos, glóbulos hialinos (**gh**), glóbulos escuros (**ge**) e vacúolos (**vc**). **sg**, seio genital; **ln**, lúmen.



Figura 3.21: Espermatogênese na gônada de *C. subdepressus* macho no estágio de **pro-**liferação. Agregados de espermatócitos entre vilosidades e associados ao espaço hemal (eh). sg, seio genital; fn, fagócito nutritivo.



Figura 3.22: Corte histológico de uma gônada de *C. subdepressus* macho no estágio **prematuro**. Grânulos densos e glóbulos hialinos (**gh**) no citoplasma de fagócitos nutritivos. Espermatogônias e espermatócitos agregados (detalhe) ao longo de toda a extensão da lâmina basal. Lúmen com espermatozóides. **sg**, seio genital; **ce**, celoma; **ez**, espermatozóides.



Figura 3.23: Corte histológico de uma gônada de *C. subdepressus* macho no estágio **maduro**. Vilosidades diminuídas; fagócitos nutritivos (**fn**) com grânulos menos densos (detalhe). Citoplasma ocupado por glóbulos hialinos (**gh**). Menor quantidade de espermatogônias; espermatogênese presente. Lúmen repleto de espermatozóides. **ez**, espermatozóides; **ce**, celoma.



Figura 3.24: Corte histológico de uma gônada de *C. subdepressus* macho no estágio **pós-liberação**. Fagócitos nutritivos com mínima quantidade de grânulos; aparência porosa. Espermatogênese ausente. Lúmen com espermatozóides remanescentes. **ez**, espermatozóides; **sg**, seio genital; **ln**, lúmen; **ce**, celoma.



Figura 3.25: Vilosidade na gônada de *C. subdepressus* macho no estágio **pós-liberação**. Fagócitos nutritivos (**fn**) com mínima quantidade de grânulos; ocupado por glóbulos hialinos (**gh**), glóbulos escuros (**ge**) e vacúolos (**vc**). **In**, lúmen; **eh**, espaço hemal.

vilosidades, justamente onde encontram-se os espermatócitos (Figura 3.21). Nos agregados de espermatócitos, ocorre a diferenciação dos espermatozóides. Número reduzido ou mediano de espermatozóides no lúmen.

Prematuro (n = 6): Epitélio germinativo com vilosidades, ocupando $69,3 \pm 20,9\%$ do lúmen (Figura 3.22). Fagócitos nutritivos com muitos grânulos densos, mas aproximadamente metade do citoplasma é ocupado por glóbulos hialinos. Pequena quantidade de fagossomos, normalmente contendo 1 ou 2 espermatozóides. Maior número de espermatogônias na lâmina basal comparado ao estágio anterior (Figura 3.22). Grande quantidade de espermatócitos agregados ao longo de toda a extensão da lâmina basal da gônada e não apenas restritos aos "vales" das vilosidades como no estágio de **proliferação**. A espermatogênese parece ocorrer por todo o epitélio germinativo. Lúmen com grande quantidade de espermatozóides e



Figura 3.26: Epitélio germinativo de *C. subdepressus* macho no estágio **pós-liberação**. Fagócitos nutritivos fagocitando grande quantidade de espermatozóides. **fg**, fagossomo; **ln**, lúmen; **vc**, vacúolo; **ge**, glóbulo escuro; **gh**, glóbulo hialino; **ez**, espermatozóide.

diâmetro médio de $0.77\pm0.33\,\mathrm{mm}.$

Maduro (n = 4): Vilosidades diminuídas e ocasionais e epitélio germinativo ocupando apenas $38,2 \pm 12,5 \%$ da área gonadal. Fagócitos nutritivos menores e com menor quantidade de grânulos. Grânulos parecem menos densos (detalhe na Figura 3.23). Boa parte do citoplasma é ocupada por glóbulos hialinos, que parecem maiores que no estágio anterior. Fagossomos praticamente ausentes. Espermatogônias presentes, mas em menor quantidade. Espermatócitos ainda ocupam boa parte da extensão da lâmina basal da gônada, como no estágio anterior. Espermatogênese é menos evidente, apesar de espermátides estarem presentes nas poucas dobras do epitélio germinativo. Lúmen repleto de espermatozóides (Figura 3.23). O diâmetro médio encontrado foi o maior entre os estágios $(0,84 \pm 0,17 \text{ mm})$.

Pós-liberação (n = 4): Vilos
idades presentes ocupando 74,7 ± 19,2 % da área gonadal



Figura 3.27: Corte histológico de uma gônada de *C. subdepressus* macho no estágio **depleção**. Com vilosidades; fagócitos nutritivos com grânulos, glóbulos hialinos, glóbulos escuros e vacúolos. Fagossomos, espermatogônias, espermatócitos e espermátides ausentes. Não há espermatozóides no lúmen. **sg**, seio genital; **ln**, lúmen.

em corte transversal (Figura 3.24). Fagócitos nutritivos com mínima quantidade de grânulos densos e ocupado principalmente por glóbulos hialinos, glóbulos escuros e vacúolos. Epitélio germinativo tem aparência porosa (Figura 3.25). Grande quantidade de fagócitos nutritivos fagocitando espermatozóides. Um fagócito nutritivo, normalmente posicionado na porção mais distal de uma vilosidade, pode fagocitar enorme quantidade de espermatozóides (Figura 3.26). Em outras regiões observam-se fagossomos convencionais. Espermatogônias estão ausentes ou raras. Espermatócitos ausentes. Espermatogênese ausente. O lúmen de algumas gônadas apresentou grande quantidade de espermatozóides remanescentes, enquanto outras gônadas tinham poucos espermatozóides no lúmen. O diâmetro médio dos túbulos é de 0.58 ± 0.14 mm.

Depleção (n = 1): O epitélio germinativo exibe vilosidades e os fagócitos nutritivos apresentam certa quantidade de grânulos, glóbulos hialinos, glóbulos escuros e vacúolos (Figura 3.27). Fagossomos, espermatogônias, espermatócitos e espermátides estão ausentes. Não há espermatozóides no lúmen tornando difícil a identificação do sexo. O cálculo do diâmetro e porcentagem da área gonadal ocupada pelo epitélio germinativo não foi realizado devido a ausência de cortes transversais nas lâminas desta gônada.

PAS O estágio de **proliferação** parece conter uma quantidade de grânulos PAS+ no citoplasma dos fagócitos nutritivos ligeiramente maior que o estágio **prematuro**. No estágio **maduro** estes grânulos se concentram na porção distal (voltada para o lúmen) dos fagócitos nutritivos. No estágio de **pós-liberação** a quantidade de grânulos PAS+ é mínima (Figura 3.28). O padrão observado no estágio de **depleção** é bastante parecido com o estágio de **recuperação**. Os espermatozóides contêm uma quantidade mínima de inclusões PAS+ que parece não diferir entre os estágios gonadais. Os glóbulos escuros adquirem coloração castanha após a reação de PAS.



Figura 3.28: Cortes histológicos dos diferentes estágios da gônada de C. subdepressus macho mostrando grânulos PAS+. \ln , lúmen.

Espermatogênese

- Espermatogônias: Semelhante às oogônias com núcleo grande e cromatina relativamente descondensada. Citoplasma é acidófilo sem inclusões. Encontram-se aderidas à lâmina basal e têm entre 5 e 12 µm de diâmetro (Figura 3.29).
- Espermatócitos: Apresentam-se agregados à lâmina basal preferencialmente entre as vilosidades do epitélio germinativo. Material nuclear mais condensado e formato poligonal. Diâmetro menor, entre 3 e 8 µm (ver Figura 3.21).
- Espermátides: Tamanho da célula e núcleo reduzidos com diâmetro, entre 2 e 3 µm. Núcleo bastante denso, circular e posicionado na periferia. Apenas uma pequena banda de citoplasma é visível, onde se formará o flagelo. Encontram-se aderidas ao citoplasma dos fagócitos nutritivos onde ocorre a absorção de material nutritivo. Algumas células em início de diferenciação da cabeça em formato de cone e posteriormente o alongamento da cauda (ver Figura 3.21).
- **Espermatozóides:** No lúmen da gônada, com cabeça cônica de 2 a 4 µm de comprimento. Cauda é longa e acidófila (ver Figura 3.23).

Morfometria

Houve diferenças entre as médias da porcentagem do túbulo gonadal ocupada pelo epitélio germinativo (ver equação 3.1) dos estágios gonadais (Tabela 3.3 e Figura 3.30). Como os conjuntos de valores apresentam distribuição normal e variâncias homogêneas utilizamos o teste t para compará-los. A média da porcentagem do túbulo ocupada pelo epitélio germinativo do estágio **maduro** é significativamente menor do que os valores encontrados em outros estágios (Tabela 3.4).

Existe uma correlação positiva entre a área do epitélio germinativo e a área total do túbulo de r = 0.840 (coeficiente de correlação de Pearson). A correlação está represen-



Figura 3.29: Corte histológico de uma gônada de *C. subdepressus* mostrando espermatogônias (**eg**) e mitoses (**mt**). **sg**, seio genital; **gh**, glóbulo hialino; **fn**, fagócito nutritivo.

Tabela 3.3: Porcentagem da área de túbulos gonadais ocupada pelo epitélio germinativo em diferentes estágios gonadais. Valores representam a média \pm desvio padrão de cada estágio e estão expressos em porcentagem (%).

Recuperação $n = 11$	Proliferação n = 14	$\begin{array}{c} \text{Prematuro} \\ n = 15 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Maduro} \\ n = 8 \end{array}$	Pós Liberação n = 13	$\begin{array}{c} \text{Depleção} \\ n = 11 \end{array}$
$82,4\pm8,6$	$74{,}0\pm13{,}1$	$73{,}2\pm13{,}4$	$42{,}3\pm14{,}9$	$69,8\pm16,4$	$71,\!6\pm16,\!5$



(a) Machos e Fêmeas



Figura 3.30: Porcentagem da área ocupada pelo epitélio germinativo em cortes transversais de túbulos gonadais de C. subdepressus. As médias foram calculadas para cada estágio gonadal considerando (a) todos os indivíduos analisados (b) machos e (c) fêmeas.

	Recuperação	Proliferação	Prematuro	Maduro	Pós Liberação
Proliferação	1,000	-	-	-	-
Prematuro	0,883	1,000	-	-	-
Maduro	< 0,001	< 0,001	< 0,001	-	-
Pós Liberação	0,286	1,000	1,000	$<\!0,\!001$	-
Depleção	1,000	$1,\!000$	1,000	0,010	1,000

Tabela 3.4: Valores de P obtidos na comparação da porcentagem da área do túbulo ocupada pelo epitélio germinativo, através do teste t entre os diferentes estágios gonadais. Valores em negrito foram considerados significativos, $\alpha = 0.05$.

tada graficamente na Figura 3.31 e mostra a relação alométrica entre as áreas. No caso, o modelo de regressão linear é descrito pela equação y = 0.799x + 0.699.

Com o intuito de retirar o efeito do tamanho dos túbulos na análise da relação entre área total e área do epitélio germinativo, os resíduos da regressão entre as duas variáveis foram utilizados. Os resíduos representam a diferença relativa entre os pontos da correlação e a equação de regressão. Deste modo podem ser encarados como dados normalizados em relação à tendência geral da correlação, representada pela equação de regressão.

Apenas a distribuição dos resíduos do estágio **prematuro** não é normal (P = 0,004), mas as variâncias são heterogêneas entre as amostras. O teste de Wilcoxon indicou que o estágio **maduro** foi significativamente diferente dos outros estágios, exceto pelo estágio de **depleção** (Tabela 3.5). A Figura 3.32 mostra que no estágio **maduro** houve uma diminuição significativa na área ocupada pelos fagócitos nutritivos, enquanto os estágios de **recuperação**, **proliferação** e **prematuro** apresentam valores positivos, sugerindo um crescimento do epitélio germinativo nestes estágios.

O diâmetro mínimo dos túbulos gonadais foi 0,24 mm e o máximo 1,52 mm $(0,70 \pm 0,26 \text{ mm})$. Não houve diferença significativa entre machos (n = 34) e fêmeas (n = 31), nem quando comparados por estágio. O diâmetro foi maior nos estágios **prematuro** e **maduro** (Figura 3.33), mas sem diferença significativa entre os estágios gonadais.



Figura 3.31: Correlação entre a área do epitélio germinativo e a área total de túbulos gonadais de *C. subdepressus*. A amostragem inclui machos e fêmeas.

Tabela 3.5: Valores de P obtidos na comparação dos resíduos de cada estágio. O teste realizado foi o Wilcoxon par-a-par entre os diferentes estágios gonadais. Valores em negrito foram considerados significativos, $\alpha = 0.05$.

	Recuperação	Proliferação	Prematuro	Maduro	Pós Liberação
Proliferação	0,961	-	-	-	-
Prematuro	0,961	$0,\!615$	-	-	-
Maduro	0,012	0,021	0,012	-	-
Pós Liberação	$0,\!615$	0,961	$0,\!557$	0,030	-
Depleção	$0,\!557$	0,961	$0,\!615$	0,533	0,961



Figura 3.32: Resíduos da correlação entre a área do epitélio germinativo e a área total de túbulos gonadais de *C. subdepressus*. A amostragem inclui machos e fêmeas.



Figura 3.33: Diâmetro de túbulos gonadais de *C. subdepressus* em corte transversal para cada estágio de maturação das gônadas. A amostragem inclui machos e fêmeas.

3.3.4 Ciclo Reprodutivo

O número de ocorrências de cada estágio gonadal foi registrado para cada mês de coleta e a freqüência relativa de cada estágio foi calculada ao longo do ano (Figura 3.34 e Tabela 3.6).

- **Recuperação:** Ocorre com maior freqüência entre os meses de junho e agosto (40 a 60%), mas é encontrada de março a outubro de 2007.
- **Proliferação:** Estágio que mais apareceu ao longo do ano, com freqüência maior em outubro, novembro, dezembro e maio (40 a 60%).
- **Prematuro:** Concentrou-se nos meses de novembro a fevereiro, com pico de 100% em janeiro.
- Maduro: Encontrado com maior freqüência (60%) em fevereiro. Também encontrado em abril e maio, mas representava apenas 20% da amostra.
- Pós Liberação: Restrito entre março e agosto, com maior ocorrência em março (60%).
- **Depleção:** Ocorreu entre os meses de julho e outubro de 2007, com pico de 60% em setembro.

Nos meses de dezembro de 2006, janeiro e fevereiro de 2007 predominaram os estágios **prematuro** e **maduro**, os quais apareceram em freqüência menor a partir de fevereiro. De março a maio predominou o estágio de **pós-liberação**, quando então as primeiras ocorrências do estágio de **recuperação** foram registradas. De junho a outubro a população estava dividida entre indivíduos na fase de **recuperação** e **proliferação** e indivíduos nos estágios de **pós liberação** e **depleção**. Em novembro de 2007, apenas estágios de **proliferação** e **prematuro** foram identificados, como em dezembro de 2006 e janeiro de 2007. Analisamos também as freqüências relativas mensais dos estágios gonadais de fêmeas e machos (Tabelas 3.7 e 3.8). Apesar do n ser insuficiente em diversos meses, machos e fêmeas encontravam-se nos estágios **prematuro** e **maduro** nos meses de dezembro de 2006 a fevereiro de 2007 e novembro de 2007. O estágio de **proliferação** ocorreu apenas em outubro nas fêmeas, enquanto nos machos ele apenas não foi encontrado em janeiro, fevereiro, abril e setembro. Outra diferença é o estágio de **recuperação**, que nas fêmeas foi encontrado de março a agosto e nos machos ficou restrito de julho a outubro.

Tabela 3.6: Freqüências relativas mensais de cada estágio gonadal de *C. subdepressus* baseado na caracterização histológica (ver 3.3.3). Foram identificadas 5 gônadas por mês de dezembro de 2006 a novembro de 2007. Dados representados em porcentagem.

	D	J	F	М	А	М	J	J	А	S	0	Ν
Recuperação	-	-	-	20	20	20	60	40	60	40	20	-
Proliferação	40	-	-	20	-	40	20	20	20	-	40	60
Prematuro	60	100	40	-	20	-	-	-	-	-	-	40
Maduro	-	-	60	-	20	20	-	-	-	-	-	-
Pós Liberação	-	-	-	60	40	20	20	20	20	-	-	-
Depleção	-	-	-	-	-	-	-	20	-	60	40	-

n = 5 por mês

Tabela 3.7: Freqüências relativas mensais de cada estágio gonadal das fêmeas de *C. subdepressus* baseado na caracterização histológica (ver 3.3.3). Foram identificadas 5 gônadas por mês de dezembro de 2006 a novembro de 2007. Dados representados em porcentagem.

	D	J	F	М	А	М	J	J	А	S	0	N
Recuperação	-	-	-	25	50	50	100	-	100	-	-	-
Proliferação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50	-
Prematuro	100	100	50	-	-	-	-	-	-	-	-	100
Maduro	-	-	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pós Liberação	-	-	-	75	50	50	-	-	-	-	-	-
Depleção	-	-	-	-	-	-	-	100	-	100	50	-
\overline{n}	1	3	2	4	2	2	3	1	1	3	2	2



Figura 3.34: Freqüências relativas mensais de cada estágio gonadal de C. subdepressus baseado na caracterização histológica (ver 3.3.3). Foram identificadas 5 gônadas por mês de dezembro de 2006 a novembro de 2007. Dados representados em porcentagem.

Tabela 3.8: Freqüências relativas mensais de cada estágio gonadal dos machos de *C. subdepressus* baseado na caracterização histológica (ver 3.3.3). Foram identificadas 5 gônadas por mês de dezembro de 2006 a novembro de 2007. Dados representados em porcentagem.

	D	J	F	М	А	М	J	J	А	S	0	Ν
Recuperação	-	-	-	-	-	-	-	50	50	100	33	-
Proliferação	50	-	-	100	-	67	50	25	25	-	33	100
Prematuro	50	100	33	-	33	-	-	-	-	-	-	-
Maduro	-	-	67	-	33	33	-	-	-	-	-	-
Pós Liberação	-	-	-	-	33	-	50	25	25	-	-	-
Depleção	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33	-
\overline{n}	4	2	3	1	3	3	2	4	4	2	3	3

3.4 Discussão

A substância negra viscosa encontrada envolvendo as gônadas recém dissecadas de *Clype-aster subdepressus* é possivelmente composta por agregados de celomócitos com grânulos negros. Estas células foram observadas no celoma perivisceral, seio genital e espaço hemal durante a análise dos cortes histológicos (Figura 3.9b), bem como na superfície aboral de jovens (Figura 2.32a). Não encontramos na literatura referências a manchas negras ou descrições de celomócitos aderidos às gônadas de equinodermos.

A presença de pilares ósseos entremeados às gônadas dificultou a dissecção e praticamente inviabilizou a extração das cinco gônadas de cada indivíduo, já que era necessário tempo e cuidado para não danificar os tecidos. A utilização de ácido acético 5%, essencial para descalcificar o esqueleto e facilitar a dissecção, parece não ter afetado os tecidos processados para histologia.

A organização dos epitélios e espaços observada nas gônadas de *C. subdepressus* foi a mesma generalizada por Pearse e Cameron (1991, pg. 529), sendo composta de 3 epitélios, uma camada colágena e 3 espaços distintos.

A distribuição não-normal das medidas biométricas (peso, altura e espessura da

borda) pode refletir a distribuição bimodal ou assimétrica das populações de *C. subdepressus*. Uma análise mais detalhada poderá determinar se as distribuições não-normais são características das populações desta espécie ou se foram decorrentes de um viés de coleta (i.e., coleta preferencial de indivíduos maiores). Para tal, será necessário esclarecer se os jovens ocupam o mesmo habitat dos adultos (ver 2.4).

Acredita-se que o tamanho da gônada aumenta proporcionalmente com o tamanho do corpo. No entanto, esta relação nem sempre é positiva e proporcional (Pearse e Cameron, 1991). Por este motivo, o índice gonadal não deve ser usado sem conhecimento da correlação entre peso do corpo e das gônadas. A ausência de correlação entre o peso corpóreo e o peso da gônada sugere que depois de determinado tamanho o peso da gônada de *C. subdepressus* não acompanha o crescimento corpóreo. Este padrão não é incomum, havendo diversos equinodermos em que a correlação positiva entre o tamanho corpóreo e peso gonadal, presente durante a fase juvenil, não se mantém nos indivíduos adultos (e.g., Lane e Lawrence, 1979; Pearse e Cameron, 1991; Tavares e Borzone, 2006). Nestas condições, o índice gonadal não deve ser usado como normalizador do efeito do tamanho, sendo o peso gonadal adequado para comparar diferentes indivíduos. Uma estratégia simples para minimizar o efeito do tamanho é utilizar indivíduos de tamanhos semelhantes (Gonor, 1973; Lozano et al., 1995).

A caracterização dos estágios gonadais mostrou que a gametogênese de *C. subdepressus* é similar à de equinóides regulares (e.g., Holland, 1967; Byrne, 1990; Pearse e Cameron, 1991; Laegdsgaard et al., 1991; Kelly, 2000; Walker et al., 2005) e de outros equinóides irregulares (e.g., Lane e Lawrence, 1979; Bentley, 1998; Tavares e Borzone, 2006). Apesar de apresentar uma cronologia de maturação gonadal semelhante, *Cassidulus mitis* difere de *C. subdepressus*, pois não tem fagócitos nutritivos em suas gônadas (MacCord e Ventura, 2004).

Existem poucas informações na literatura sobre as vilosidades no epitélio germinativo, sendo difícil definir se são comuns entre os equinóides. Além da revisão de Pearse e Cameron (1991), as vilosidades foram descritas explicitamente na ordem Echinothurioida (Mori et al., 1980). Em *C. subdepressus* estavam presentes com freqüência em todos os estágios, exceto no estágio **maduro**, onde eram raras e diminuídas (Figura 3.12 e 3.23). Neste estágio observamos a exaustão de recursos dos fagócitos nutritivos e uma diminuição significativa na área ocupada pelo epitélio germinativo. A maturação gonadal está potencialmente envolvida com a diminuição das vilosidades.

A variação da espessura do epitélio germinativo parece mais acentuada em equinóides regulares quando comparada aos dados de *C. subdepressus* (porcentagem da área do túbulo ocupada). Enquanto a maior diferença na espessura do epitélio germinativo foi cerca de 40% em *C. subdepressus*, nos ouriços-do-mar esta amplitude parece chegar aos 90% (e.g., Walker et al., 2005). Verificamos por meio de uma análise de regressão entre a área ocupada pelos fagócitos nutritivos e a área total dos túbulos gonadais que a única alteração drástica no epitélio germinativo ocorre no estágio **maduro** (Figura 3.32). Estágios posteriores à liberação dos gametas (**pós-liberação** e **depleção**) sugerem que o epitélio germinativo recupere rapidamente sua espessura. Por sua vez, os valores positivos dos resíduos da regressão acima coincidiram com os estágios que apresentam maior densidade de grânulos PAS+ e peso gonadal superior (**proliferação** e **prematuro**), sugerindo que o epitélio germinativo está aumentado. Contudo, cabe lembrar que estes estágios não diferiram significativamente do estágio de **pós-liberação** (ver Tabela 3.5).

Câmaras de incubação onde fagócitos nutritivos envolvem e nutrem os oócitos até sua maturação foram descritas formalmente em *S. droebachiensis* (Walker et al., 2005). Em *C. subdepressus* encontramos estruturas muito semelhantes onde um ou mais fagócitos nutritivos delimitavam um espaço para cada oócito. Esta é a primeira descrição destas câmaras em um clipeasteróide, apesar delas poderem ser reconhecidas nos cortes histológicos de *M. quinquiesperforata* (Lane e Lawrence, 1979; Tavares e Borzone, 2006). Walker et al. (2005) sugeriu que o espaço presente entre os fagócitos nutritivos e os oócitos vitelogênicos (mais maduros) não seja um artefato, mas sim a camada gelatinosa sendo secretada. Apesar de ter sido observado em alguns oócitos de *C. subdepressus* (Figura 3.16d), este espaço não foi encontrado de maneira consistente entre os oócitos mais maduros. Além disso, não observamos extensões citoplasmáticas dos fagócitos nutritivos neste espaço, apenas microvilosidades dos óvulos.

Nos machos de *S. droebachiensis*, as câmaras de incubação são formadas por diversos fagócitos nutritivos que abrigam muitas células espermatogênicas (Walker et al., 2005). Algo similar também foi observado em *C. subdepressus*, mas na maioria das gônadas masculinas as espermatogônias e espermatócitos se posicionavam entre as vilosidades, em contato direto com o espaço hemal, enquanto as espermátides encontravam-se aderidas aos fagócitos nutritivos.

O posicionamento das espermatogônias e espermatócitos junto aos canais hemais, reforça a suposição de que o fluido hemal tenha alguma influência sobre a gametogênese (Pearse e Cameron, 1991, pg. 542). Como descrito por Byrne et al. (1999) no gênero *Heliocidaris*, o conteúdo do espaço hemal de algumas gônadas de *C. subdepressus* parece ser PAS+. Contudo, não analisamos a ocorrência de líquido hemal PAS+ entre os diferentes estágios gonadais ou diferenças entre machos e fêmeas.

As gônadas de *C. subdepressus* apresentaram diferenças quanto a proporção de conteúdos citoplasmáticos dos fagócitos nutritivos. As estruturas mais variáveis foram os glóbulos hialinos e escuros, que estavam presentes em gônadas de diferentes estágios e presentes em proporções diferentes em gônadas do mesmo estágio. Estas inclusões representam, possivelmente, etapas do processo de fagocitose, como descritas por Kalachev et al. (2005) no ouriço-do-mar *Strongylocentrotus nudus*: fagossomos contendo corpos residuais da gametogênese ou espermatozóides fundem-se com grânulos eletrodensos, aumentando de tamanho e ficando mais escuros (correspondentes aos glóbulos escuros); os fagossomos tardios tornam-se mais claros e com material floculado no seu interior; a matriz é destruída, restando um vacúolo eletrotransparente (correspondente ao glóbulo hialino), que é comprimida pelo citoplasma dos fagócitos nutritivos. Um processo semelhante ao que ocorre com autolisossomos de fagócitos nutritivos do ouriço-do-mar Anthocidaris crassispina também pode explicar a origem e composição destes glóbulos (Reunov et al., 2004). Uma descrição mais apurada destas inclusões citoplasmáticas requer um estudo em microscopia eletrônica de transmissão.

A fagocitose de espermatozóides remanescentes do ciclo gametogênico anterior predominou nos estágios de **pós-liberação** e **recuperação**. No estágio de **proliferação** encontramos espermatozóides sendo fagocitados e se diferenciando, sugerindo que existe um controle molecular que permite diferenciar espermatozóides mais velhos dos recémdiferenciados. Por este motivo, é provável que ocorra a renovação total dos espermatozóides a cada ciclo gametogênico de *C. subdepressus*. A quantidade de espermatozóides fagocitadas por cada fagócito nutritivo foi intensa, mas não observamos oócitos ou óvulos sendo fagocitados. Masuda e Dan (1977) sugerem que o tamanho seja um fator limitante para a fagocitose e que os fagócitos nutritivos auxiliem na degeneração de gametas residuais através da atividade da fosfatase ácida. A presença de um fagócito nutritivo junto de um óvulo autofágico foi confirmada por Walker et al. (2005), mas não encontramos imagens conclusivas nos cortes histológicos de *C. subdepressus*.

Embora a amostragem abranja apenas 12 meses e o n tenha sido pequeno, a análise das freqüências relativas revelou um padrão consistente entre machos e fêmeas. Por exemplo, nos meses de dezembro de 2006 a fevereiro de 2007 (incluindo novembro de 2007), todos os indivíduos amostrados estavam em estágios proliferativos ou maduros. Outro padrão interessante foi a sobreposição de indivíduos que estavam finalizando o ciclo anterior (**pós liberação** e **depleção**) e indivíduos que já iniciaram o novo ciclo de maturação (**recuperação**), que ocorreu de maio a outubro de 2007. Machos e fêmeas diferiram somente na extensão em que um estágio gonadal está presente na população. Além de permanecerem por mais tempo no estágio **maduro**, encontramos machos em estágio de **proliferação** na maior parte do ano. A maioria dos equinóides acumula espermatozóides e libera-os apenas em períodos discretos do ano (Pearse e Cameron, 1991), mesmo que o ciclo gametogênico seja curto, entre 1 e 2 meses (Holland, 1967). No período de julho a outubro, machos de *C. subdepressus* apresentaram as menores porcentagens do estágio de **proliferação**, predominando indivíduos em **recuperação**. O período de recuperação é diferente nas fêmeas, ocorrendo de março a junho. A recuperação das gônadas logo após a liberação dos óvulos é condizente com a rápida ocupação do epitélio germinativo após o estágio **maduro**.

As freqüências relativas de estágios gonadais encontradas por Tavares e Borzone (2006) na bolacha-do-mar M. quinquiesperforata, no litoral do estado do Paraná, mostraram que os estágios **prematuro** e **maduro** ocorrem no verão, assim como em C. subdepressus. No entanto, M. quinquiesperforata parece apresentar mais flutuações nas freqüências relativas, quando comparado ao ciclo de C. subdepressus. O ciclo reprodutivo de C. subdepressus é comparável ao ciclo de M. quinquiesperforata da Florida (Lane e Lawrence, 1979), onde a proliferação de material nutritivo ocorre de novembro a dezembro e os óvulos maduros começam a aparecer em fevereiro. Contudo, a liberação de óvulos desta população é mais longa, de março a junho, enquanto a liberação de C. subdepressus parece restrita a fevereiro.

Como *C. subdepressus* foi amostrada de 3 populações diferentes (Portinho, Parcel e Praia Preta), a presente análise do ciclo reprodutivo assume que a maturação gonadal dessas populações esteja sincronizada. Diversos estudos demonstraram que populações distintas de equinóides apresentam gametogênese sincrônica e que o fotoperíodo é o fator mais influente para a maturação gonadal (e.g., Gonor, 1973; Byrne, 1990; Lozano et al., 1995; Bentley, 1998; Byrne et al., 1998; Kelly, 2000). Assim, assume-se que a origem dos indivíduos não comprometeu a interpretação dos resultados, não tendo sido analisados quais fatores arrastam o ciclo de maturação gonadal de *C. subdepressus* ou o que controla a liberação dos gametas no habitat.

O padrão reprodutivo encontrado em *C. subdepressus* de São Sebastião diferiu do estudo feito com a mesma espécie no Caribe. Verificou-se que boa parte da população

caribenha libera gametas ao longo de todo o ano, sugerindo que o ciclo reprodutivo não é anual (Lessios, 1985). A diferença entre as duas populações de *C. subdepressus* estudadas pode ser decorrente do método indireto utilizado por Lessios (1985) para avaliar a maturidade dos exemplares (liberação dos gametas e diâmetro dos óvulos). Entretanto, como a gametogênese de equinóides é fortemente influenciada pelo fotoperíodo (Byrne et al., 1998), é possível que *C. subdepressus* de São Sebastião tenha um ciclo reprodutivo mais definido devido a sua localização geográfica. Para testar esta hipótese, é necessário um estudo comparativo simultâneo da gametogênese de *C. subdepressus* em latitudes diversas.

A combinação das observações do Capítulo 2, peso gonadal, morfometria das gônadas e histologia indicam que a maturação gonadal de diferentes indivíduos de *C. subdepressus* foi sincronizada entre dezembro de 2006 e novembro de 2007. Sugerimos que o ciclo reprodutivo das populações de São Sebastião é anual com um período de recuperação das gônadas durante o inverno, acúmulo de nutrientes a partir de outubro e liberação de gametas restrito a fevereiro nas fêmeas e de fevereiro a maio nos machos.
Referências Bibliográficas

- Arthur, W. (2002). The emerging conceptual framework of evolutionary developmental biology. *Nature*, 415:757–764.
- Arthur, W. (2004). The effect of development on the direction of evolution: toward a twenty-first century consensus. *Evolution & Development*, 6(4):282–288.
- Aung, W. (1975). Observations on the reproductive biology of the tropical sand dollar Arachnoides placenta (L.) (Echinoidea: Echinodermata). Master's thesis, James Cook University of North Queensland.
- Balch, T. e Scheibling, R. E. (2001). Echinoderm Studies, volume 6 de Echinoderm Studies, capítulo Larval supply, settlement and recruitment in echinoderms, pgs. 1–83.
 A.A. Balkema, Rotterdan, Netherlands.
- Bentley, A. (1998). Reproductive cycle and gonadal histology of *Echinodiscus bisperfo*ratus along the Southern Coast of South Africa. Em Mooi e Telford, editores, *Echino*derms: San Francisco.
- Birkeland, C. e Chia, F.-S. (1971). Recruitment risk, growth, age and predation in two populations of sand dollars, *Dendraster excentricus* (Eschscholtz). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 6(3):265–278.
- Burke, R. D. (1980). Podial sensory receptors and the induction of metamorphosis in echinoids. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 47(3):223–234.

Buss, L. W. (1987). The evolution of individuality. Princenton University Press.

- Byrne, M. (1990). Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin Paracentrotus lividus from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the West Coast of Ireland. Marine Biology, 104:275–289.
- Byrne, M., Andrew, N. L., Worthington, D. G., e Brett, P. A. (1998). Reproduction in the diadematoid sea urchin *Centrostephanus rodgersii* in contrasting habitats along the coast of New South Wales, Australia. *Marine Biology*, 132(2):305–318.
- Byrne, M., Villinski, J. T., Cisternas, P., Siegel, R. K., Popodi, E., e Raff, R. A. (1999). Maternal factors and the evolution of developmental mode: evolution of oogenesis in *Heliocidaris erythrogramma. Dev Genes Evol*, 209(5):275–283.
- Caldwell, J. W. (1972). Development, metamorphosis, and substrate selection of the larvae of the sand dollar, *Mellita quinquesperforata* (Leske, 1778). Master's thesis, University of Florida.
- Cameron, R. A. e Rumrill, S. S. (1982). Larval abundance and recruitment of the sand dollar *Dendraster excentricus* in Monterey Bay, California, USA. *Marine Biology*, 71(2):197–202.
- Chia, F.-S. (1977). Structure and function of the genital papillae in a tropical sand dollar, Arachnoides placenta (L.) with a discussion on the adaptive significance of genital papillae in echinoids. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 27(2):187–194.
- Devanesen, D. W. (1922). The development of the calcareous parts of the lantern of Aristotle in Echinus miliaris. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character (1905-1934), 93(655):468–485.

- Dover, G. A. (2000). How genomic and developmental dynamics affect evolutionary processes. *BioEssays*, 22:1153–1159.
- Durham, J. W. (1955). Classification of clypeasteroid echinoids. University of California Publications in Geological Sciences, 31(4):73–198.
- Emlet, R. B. (1986). Facultative planktotrophy in the tropical echinoid Clypeaster rosaceus (Linnaeus) and a comparison with obligate planktotrophy in Clypeaster subdepressus (Gray) (Clypeasteroida: Echinoidea). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 95:183–202.
- Gilbert, S. F. (1997). Developmental Biology. Sinauer Associates, Inc., 5th edition.
- Gonor, J. J. (1973). Reproductive cycles in Oregon populations of the echinoid, Strongylocentrotus purpuratus (Stimpson). I. Annual gonad growth and ovarian gametogenic cycles. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 12(1):45–64.
- Gordon, I. (1926). The development of the calcareous test of Echinus miliaris. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character (1896-1934), 214:259–312.
- Gordon, I. (1929). Skeletal development in Arbacia, Echinarachnius and Leptasterias. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character (1896-1934), 217:289–334.
- Gosselin, P. e Jangoux, M. (1998). From competent larva to exotrophic juvenile: a morphofunctional study of the perimetamorphic period of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoida). *Zoomorphology*, 118(1):31–43.
- Hamaguchi, M. e Hiramoto, Y. (1980). Fertilization process in the heart-urchin, Clypeaster japonicus observed with a differential interference microscope. Development, Growth & Differentiation, 22(3):517–530.

- Hardin, J. (1988). The role of secondary mesenchyme cells during sea urchin gastrulation studied by laser ablation. *Development*, 103(2):317–324.
- Harrington, L. H., Walker, C. W., e Lesser, M. P. (2007). Stereological analysis of nutritive phagocytes and gametogenic cells during the annual reproductive cycle of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Invertebrate Biology*, 126(2):202– 209.
- Hart, M. W. (2002). Life history evolution and comparative developmental biology of echinoderms. *Evolution & Development*, 4(1):62–71.
- Hendler, G., Miller, J., Pawson, D., e Kier, P. (1995). Echinoderms of Florida and the Caribbean Sea Stars, Sea Urchins and Allies. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Highsmith, R. C. (1982). Induced settlement and metamorphosis of sand dollar (*Den-draster excentricus*) larvae in predator-free sites: adult sand dollar beds. *Ecology*, 63(2):329–337.
- Holland, N. D. (1967). Gametogenesis during the annual reproductive cycle in a cidaroid sea urchin (*Stylocidaris affinis*). *Biological Bulletin*, 133(3):578–590.
- Hyman, L. H. (1955). The Invertebrates: Echinodermata, volume IV. McGraw-Hill Book Company, Inc.
- Jamieson, B. G. M. (1985). The spermatozoa of the Holothuroidea (Echinodermata): an ultrastructural review with data on two Australian species and phylogenetic discussion. *Zoologica Scripta*, 14(2):123–135.
- Kalachev, A., Yurchenko, O., e Reunov, A. (2005). Phagocytic activity of accessory cells in the gonad of the sea urchin Strongylocentrotus nudus. Russian Journal of Marine Biology, 31(5):318–321.

- Kang, D.-H., Yang, H.-S., Park, H.-S., e Choi, K.-S. (2007). Use of plate growth measurement for the estimation of skeletal growth of two sand dollars, *Astriclypeus manni* (Verrill 1867) and *Clypeaster japonicus* (Döderlein 1885), in Jeju, Korea. *Plankton and Benthos Research*, 2(2):77–82.
- Kelly, M. S. (2000). The reproductive cycle of the sea urchin Psammechinus miliaris (Echinodermata: Echinoidea) in a Scottish sea loch. Journal of the Marine Biological Association of the UK, 80(05):909–919.
- Kier, P. (1982). Rapid evolution in echinoids. *Palaeontology*, 25(1):1–9.
- Kominami, T. e Takata, H. (2000). Cellular basis of gastrulation in the sand dollar Scaphechinus mirabilis. Biological Bulletin, 199(3):287–297.
- Kurakin, A. (2005). Self-organization vs watchmaker: stochastic gene expression and cell differentiation. Development Genes and Evolution, 215:46–52.
- Kutschera, U. e Niklas, K. J. (2004). The modern theory of biological evolution: an expanded synthesis. *Naturwissenschaften*, 91(6):255–276.
- Laegdsgaard, P., Byrne, M., e Anderson, D. T. (1991). Reproduction of sympatric populations of *Heliocidaris erythrogramma* and *H. tuberculata* (Echinoidea) in New South Wales. *Marine Biology*, 110(3):359–374.
- Lane, J. e Lawrence, J. (1979). Gonadal growth and gametogenesis in the sand dollar Mellita quinquiesperforata (Leske, 1778). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 38(3):271–285.
- Lessios, H. (1985). Annual reproductive periodicity in eight echinoid species on the Caribbean coast of Panama. Em Keegan, B. F. e O'Connor, B. D. S., editores, *Proceedings* of the Fifth International Echinoderm Conference, Galway, 24-29 September 1984.

- Lessios, H. (1987). Temporal and spatial variation in egg size of 13 Panamanian echinoids. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 114:217–239.
- Lozano, J., Galera, J., López, S., Turon, X., C., P., e Morera, G. (1995). Biological cycles and recruitment of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Marine Ecology Progress Series*, 122:179–191.
- Mabee, P. M. (2006). Integrating evolution and development: The need for bioinformatics in evo-devo. *BioScience*, 56(4):301–309.
- MacCord, F. e Ventura, C. (2004). Reproductive cycle of the endemic cassiduloid Cassidulus mitis (Echinoidea: Cassiduloida) on the Brazilian Coast. Marine Biology, 145:603–612.
- Masuda, R. e Dan, J. C. (1977). Studies on the annual reproductive cycle of the sea urchin and the acid phosphatase activity of relict ova. *Biological Bulletin*, 153(3):577–590.
- McEdward, L. R. e Miner, B. G. (2001). Larval and life-cycle patterns in echinoderms. Canadian Journal of Zoology, 79:1125–1170.
- Miller, B. A. e Emlet, R. B. (1999). Development of newly metamorphosed juvenile sea urchins (Strongylocentrotus franciscanus and S. purpuratus): morphology, the effects of temperature and larval food ration, and a method for determining age. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 235(1):67–90.
- Miner, B. G., McEdward, L. A., e McEdward, L. R. (2005). The relationship between egg size and the duration of the facultative feeding period in marine invertebrate larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 321(2):135–144.
- Mooi, R. (1990). Paedomorphosis, Aristotle's lantern, and the origin of the sand dollars (Echinodermata: Clypeasteroida). *Paleobiology*, 16(1):25–48.

- Mori, T., Tsuchiya, T., e Amemiya, S. (1980). Annual gonadal variation in sea urchins of the orders Echinothurioida and Echinoida. *Biological Bulletin*, 159(3):728–736.
- Mortensen, T. (1921). Studies of the Development and Larval Forms of Echinoderms.G.E.C. Gad.
- Mortensen, T. (1948). A Monograph of the Echinoidea IV.2. Clypeastroida. Clypeastridae, Arachnoididae, Fibulariidae, Laganidae and Scutelidae. A Monograph of the Echinoidea. C.A. Reitzelpublisher, Copenhagen.
- Netto, L., Hadel, V., e Tiago, C. (2005). Echinodermata from São Sebastião Channel (São Paulo, Brazil). Revista de Biología Tropical (International Journal of Tropical Biology and Conservation), 53 (Suppl.3):207–218.
- Nunes, C. D. A. P. e Jangoux, M. (2007). Larval growth and perimetamorphosis in the echinoid *Echinocardium cordatum* (echinodermata): the spatangoid way to become a sea urchin. *Zoomorphology*, 126(2):103–119.
- Pearse, J. S. e Cameron, R. A. (1991). Echinoderms and Lophophorates, volume VI de Reproduction of Marine Invertebrates, capítulo Echinodermata: Echinoidea, pgs. 513–662. Boxwood Press.
- Pearse, J. S. e Pearse, V. B. (1975). Growth zones in the echinoid skeleton. American Zoologist, 15(3):731–751.
- Pechenik, J. A. (2006). Larval experience and latent effects-metamorphosis is not a new beginning. *Integrative and Comparative Biology*, 46(3):323–333.
- R Development Core Team (2005). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- Raff, R. A. (1992). Direct-developing sea urchins and the evolutionary reorganization of early development. *BioEssays*, 14(4):211–218.

- Rasband, W. S. (1997-2008). ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. http://rsb.info.nih.gov/ij/.
- Raup, D. M. (1968). Theoretical morphology of echinoid growth. Journal of Paleontology. Paleobiological Aspects of Growth and Development: A Symposium (Sep., 1968), 2:50–63. Memoir (The Paleontological Society), Vol. 2, Supplement to Vol. 42, no. 5 of the Journal of Paleontology.
- Reitzel, A. e Heyland, A. (2007). Reduction in morphological plasticity in echinoid larvae: relationship of plasticity with maternal investment and food availability. *Evolutionary Ecology Research*, 9(1):109–121.
- Reitzel, A. e Miner, B. (2007). Reduced planktotrophy in larvae of *Clypeaster*. Marine Biology, 151(4):1525–1534.
- Reunov, A. A., Yurchenko, O. V., Kalachev, A. V., e Au, D. W. T. (2004). An ultrastructural study of phagocytosis and shrinkage in nutritive phagocytes of the sea urchin *Anthocidaris crassispina. Cell and Tissue Research*, 318(2):419–428.
- Russell, M. P. e Meredith, R. W. (2000). Natural growth lines in echinoid ossicles are not reliable indicators of age: a test using *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Invertebrate Biology*, 119(4):410–420.
- Saucède, T., Mooi, R., e David, B. (2007). Phylogeny and origin of Jurassic irregular echinoids (Echinodermata: Echinoidea). *Geological Magazine*, 144:333–359.
- Schatten, G. (1981). The movements and fusion of the pronuclei at fertilization of the sea urchin Lytechinus variegatus: time-lapse video microscopy. Journal of Morphology, 167(2):231–247.
- Smith, A. B. (1997). Echinoderm larvae and phylogeny. Annual Reviews of Ecology and Systematics, 28:219–241.

- Smith, A. B. (2001). Probing the cassiduloid origins of clypeasteroid echinoids using stratigraphically restricted parsimony analysis. *Paleobiology*, 27(2):392–404.
- Smith, A. B. e Anzalone, L. (2000). *Loriolella*, a key taxon for understanding the early evolution of irregular echinoids. *Palaeontology*, 43(2):303–324.
- Smith, M. S., Zigler, K. S., e Raff, R. A. (2007). Evolution of direct-developing larvae: selection vs loss. *BioEssays*, 29(6):566–571.
- Strathmann, M. F. (1987). Reproduction and development of marine invertebrates of the northern Pacific coast: data and methods for the study of eggs, embryos, and larvae. University of Washington Press.
- Strathmann, R. R. (1978). The evolution and loss of feeding larval stages of marine invertebrates. *Evolution*, 32(4):894–906.
- Takata, H. e Kominami, T. (2001). Ectoderm exerts the driving force for gastrulation in the sand dollar Scaphechinus mirabilis. Development, Growth & Differentiation, 43(3):265–274.
- Takata, H. e Kominami, T. (2004a). Behavior of pigment cells closely correlates the manner of gastrulation in sea urchin embryos. *Zoological Science*, 21(10):1025–1035.
- Takata, H. e Kominami, T. (2004b). Pigment cells trigger the onset of gastrulation in tropical sea urchin *Echinometra mathaei*. Development, Growth & Differentiation, 46(1):23–35.
- Tavares, Y. A. G. e Borzone, C. A. (2006). Reproductive cycle of Mellita quinquiesporforata (Leske) (Echinodermata, Echinoidea) in two contrasting beach environments. *Revista Brasileira de Zoologia*, 23(2):573–580.
- Tommasi, L. (1966). Lista dos equinóides recentes do brasil. Contribuições Avulsas do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, 11:1–50.

- Walker, C. W., Harrington, L. M., Lesser, M. P., e Fagerberg, W. R. (2005). Nutritive phagocyte incubation chambers provide a structural and nutritive microenvironment for germ cells of *Strongylocentrotus droebachiensis*, the green sea urchin. *Biological Bulletin*, 209(1):31–48.
- Wray, G. A. (1995). Punctuated evolution of embryos. Science, 267:1115–1116.
- Wray, G. A. (1996). Parallel evolution of nonfeeding larvae in echinoids. Systematic Biology, 45(3):308–322.
- Wray, G. A. (1997). Embryology: constructing the organism, capítulo Echinoderms, pgs. 309–329. Sinauer Associates, Inc.
- Wray, G. A. e Bely, A. E. (1994). The evolution of echinoderm development is driven by several distinct factors. *Development*, 97(Supplement):97–106.
- Yajima, M. (2007). Evolutionary modification of mesenchyme cells in sand dollars in the transition from indirect to direct development. *Evolution & Development*, 9(3):257– 266.
- Zar, J. H. (1996). Biostatistical Analysis. Prentice-Hall Internacional, Inc., Upper Saddle River, NJ, USA, Third edition.
- Zigler, K. S., Lessios, H. A., e Raff, R. A. (2008). Egg energetics, fertilization kinetics, and population structure in echinoids with facultatively feeding larvae. *Biological Bulletin*, 215(2):191–199.
- Zoeke, M. (1952). Sur la croissance du squelette des Clypeaster fossiles. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, 234:1999–2002.